

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 173**

51 Int. Cl.:

A61K 36/73 (2006.01)
A61K 36/481 (2006.01)
A61K 36/36 (2006.01)
A61K 36/344 (2006.01)
A61K 36/258 (2006.01)
A61K 36/074 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61K 36/068 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2013 PCT/CN2013/000619**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13177944**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2013 E 13796431 (8)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2857030**

54 Título: **Composición de uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas**

30 Prioridad:

29.05.2012 CN 201210169736

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.03.2019

73 Titular/es:

JIANGZHONG PHARMACEUTICAL CO., LTD.
(100.0%)
No. 788 Huoju Avenue Gaoxin Dev District
Nanchang
Jiangxi 330096, CN

72 Inventor/es:

ZHONG, HONGGUANG;
YI, MINZHI y
LU, JIANZHONG

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 703 173 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición de uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición para la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas y al uso de la misma.

10 **Técnica antecedente**

La solicitud de patente CN1509760A divulga un medicamento para la prevención y el tratamiento adyuvante del cáncer fabricada con las materias primas de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado, *Ganoderma* y *Fructus lycii*, que funciona para mejorar la inmunidad y regular el sistema endocrino, y también desempeña un papel en la limpieza de los radicales libres perjudiciales para el organismo y en la prevención de la recurrencia del tumor. La solicitud de patente CN102228252A divulga una composición de la medicina tradicional china con de 5 a 150 partes en peso de *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, de 5 a 160 partes en peso de *Ganoderma* y de 1 a 90 partes en peso de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado, que funciona para aliviar la fatiga física. La solicitud de patente CN102000129A divulga una composición farmacéutica que comprende polisacáridos de *Cordyceps* o *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado, *Ganoderma* y *Radix panacis quinquefolii*, que funciona para mejorar la inmunidad. Hasta ahora, ningún informe ni literatura ha demostrado que una composición hecha de *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps* funcione para prevenir y tratar enfermedades alérgicas.

25 **Sumario de la Invención**

El objetivo de la presente invención es proporcionar una composición para la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas y su método de preparación.

La presente invención se define en las reivindicaciones. De acuerdo con la presente divulgación que comprende la invención, se seleccionan y combinan las materias primas *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos rosae rugosae*, y sorprendentemente, se encontró que dicha composición o productos fabricados a partir de la misma eran capaces de prevenir y tratar enfermedades alérgicas.

Se proporciona el uso de una composición que comprende *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, una composición hecha de materias primas que comprenden *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, o una composición hecha de *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, en la fabricación de productos para el cuidado de la salud, medicamentos o productos para la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas. Se proporciona el uso de una composición preparada mediante la adición de uno cualquiera o más componentes de *Flos rosae rugosae*, esporas de *Ganoderma* en polvo, aceite de esporas de *Ganoderma*, *Radix pseudostellariae*, *Folium ginseng*, *Radix codonopsis* y *Radix astragali* a una composición que comprende *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, o a una composición hecha de materias primas que comprenden *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, o a una composición hecha de *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, en la fabricación de productos para el cuidado de la salud, medicamentos o productos para la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas.

Se proporciona el uso de una composición que comprende *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos rosae rugosae*, una composición hecha de materias primas que comprenden *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos rosae rugosae*, o una composición hecha de *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos rosae rugosae*, en la fabricación de productos para el cuidado de la salud, medicamentos o productos para la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas.

Se proporciona el uso de una composición preparada mediante la adición de uno cualquiera o más componentes de esporas de *Ganoderma* en polvo, aceite de esporas de *Ganoderma*, *Radix pseudostellariae*, *Folium ginseng*, *Radix codonopsis* y *Radix astragali* a una composición que comprende *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos Rosae Rugosae*, o a una composición hecha de materias primas que comprenden *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos rosae rugosae*, o a una composición hecha de *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos rosae rugosae*, en la fabricación de productos para el cuidado de la salud, medicamentos o

Se proporciona el uso de una composición que comprende *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, una composición hecha de materias primas que comprenden *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, o una composición hecha de *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, en la fabricación de productos para el cuidado de la salud, medicamentos o productos para la prevención y el tratamiento de la urticaria.

Se proporciona el uso de una composición preparada mediante la adición de uno cualquiera o más componentes de *Flos rosae rugosae*, esporas de *Ganoderma* en polvo, aceite de esporas de *Ganoderma*, *Radix pseudostellariae*, *Folium ginseng*, *Radix codonopsis* y *Radix astragali* a una composición que comprende *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, o a una composición hecha de materias primas que comprenden *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, o a una composición hecha de *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, en la fabricación de productos para el cuidado de la salud, medicamentos o productos para la prevención y el tratamiento de la urticaria.

Se proporciona el uso de una composición que comprende *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos rosae rugosae*, una composición hecha de materias primas que comprenden *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos rosae rugosae*, o una composición hecha de *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos rosae rugosae*, en la fabricación de productos para el cuidado de la salud, medicamentos o productos para el cuidado de la salud, medicamentos o productos para la prevención y el tratamiento de la urticaria. Se proporciona el uso de una composición preparada mediante la adición de uno cualquiera o más componentes de esporas de *Ganoderma* en polvo, aceite de esporas de *Ganoderma*, *Radix pseudostellariae*, *Folium ginseng*, *Radix codonopsis* y *Radix astragali* a una composición que comprende *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos Rosae Rugosae*, o a una composición hecha de materias primas que comprenden *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos rosae rugosae*, o a una composición hecha de *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos rosae rugosae*, en la fabricación de productos para el cuidado de la salud, medicamentos o productos para la prevención y el tratamiento de la urticaria.

Se proporciona el uso de una composición que comprende *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, una composición hecha de materias primas que comprenden *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, o una composición hecha de *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, en la fabricación de productos para el cuidado de la salud, medicamentos o productos para la prevención y el tratamiento del asma alérgico.

Se proporciona el uso de una composición preparada mediante la adición de uno cualquiera o más componentes de *Flos rosae rugosae*, esporas de *Ganoderma* en polvo, aceite de esporas de *Ganoderma*, *Radix pseudostellariae*, *Folium ginseng*, *Radix codonopsis* y *Radix astragali* a una composición que comprende *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, o a una composición hecha de materias primas que comprenden *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, o a una composición hecha de *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, en la fabricación de productos para el cuidado de la salud, medicamentos o productos para la prevención y el tratamiento del asma alérgico.

Se proporciona el uso de una composición que comprende *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos rosae rugosae*, una composición hecha de materias primas que comprenden *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos rosae rugosae*, o una composición hecha de *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos rosae rugosae*, en la fabricación de productos para el cuidado de la salud, medicamentos o productos para la prevención y el tratamiento del asma alérgico.

Se proporciona el uso de una composición preparada mediante la adición de uno cualquiera o más componentes de esporas de *Ganoderma* en polvo, aceite de esporas de *Ganoderma*, *Radix pseudostellariae*, *Folium ginseng*, *Radix codonopsis* y *Radix astragali* a una composición que comprende *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos Rosae Rugosae*, o a una composición hecha de materias primas que comprenden *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos rosae rugosae*, o a una composición hecha de *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y *Flos rosae rugosae*, en la fabricación de productos para el cuidado de la salud, medicamentos o productos para la prevención y el tratamiento del asma alérgico.

El término "productos" en los "productos para el cuidado de la salud, medicamentos o productos" mencionados anteriormente incluye aquellos que no están incluidos en los "productos para el cuidado de la salud" o "medicamentos", incluyendo los artículos que usan la composición de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, aceites esenciales, productos de incienso y almohadas.

Preferentemente, la composición para su uso de acuerdo con la presente invención para la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas está hecha de las siguientes materias primas en partes en peso: de 5 a 200 partes de *Ganoderma*, de 5 a 150 partes de *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, de 1 a 90 partes de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o de 1 a 120 partes de *Cordyceps* y de 5 a 90 partes en peso de *Flos rosae rugosae*.

Se prefiere de 20 a 120 partes de *Ganoderma*, de 10 a 90 partes de *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, de 3 a 60 partes de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o de 3 a 90 partes de *Cordyceps*.

Se prefieren más 40 partes de *Ganoderma*, 30 partes de *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, 20 partes de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o 6,7 partes de *Cordyceps*.

La composición para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender además las siguientes materias adicionales que no comprometen la eficacia de la presente invención, o extractos de agua y/o alcohol de estas materias adicionales, en partes en peso: uno o más de 5 a 90 partes de *Flos rosae rugosae*, de 5 a 150 partes de esporas de *Ganoderma* en polvo, de 1 a 90 partes de aceite de esporas de *Ganoderma*, de 10 a 400 partes de *Radix pseudostellariae*, de 1 a 120 partes de *Folium ginseng*, de 3 a 400 partes de *Radix codonopsis* y de 3 a 400 partes de *Radix astragali*, o cualquiera de sus combinaciones.

Se prefieren uno o más de 10 a 60 partes de *Flos rosae rugosae*, de 10 a 120 partes de esporas de *Ganoderma* en polvo, de 10 a 60 partes de aceite de esporas de *Ganoderma*, de 20 a 200 partes de *Radix pseudostellariae*, de 20 a 90 partes de *Folium ginseng*, de 20 a 200 partes de *Radix codonopsis* y de 20 a 200 partes de *Radix astragali*, o cualquiera de sus combinaciones.

Se prefieren más uno o más de 30 partes de *Flos rosae rugosae*, 30 partes de esporas de *Ganoderma* en polvo, 20 partes de aceite de esporas de *Ganoderma*, 40 partes de *Radix pseudostellariae*, 30 partes de *Folium ginseng*, 40 partes de *Radix codonopsis* y 40 partes de *Radix astragali*, o cualquiera de sus combinaciones.

Preferentemente, la composición para su uso de acuerdo con la presente invención es una composición de 5 a 200 partes de *Ganoderma*, de 5 a 150 partes de *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, de 1 a 90 partes de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o de 1 a 120 partes de *Cordyceps* y de 5 a 90 partes de *Flos rosae rugosae*.

Se prefiere más de 20 a 120 partes de *Ganoderma*, de 10 a 90 partes de *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, de 3 a 60 partes de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o de 3 a 90 partes de *Cordyceps* y de 10 a 60 partes de *Flos rosae rugosae*.

Se prefieren más 40 partes de *Ganoderma*, 30 partes de *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, 20 partes de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o 6,7 partes de *Cordyceps* y 30 partes de *Flos rosae rugosae*.

De acuerdo con la presente divulgación, *Folium ginseng*, *Radix pseudostellariae*, *Radix codonopsis* y/o *Radix astragali* se pueden usar en lugar de *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan las composiciones que se han mencionado anteriormente.

El término "*Ganoderma*", como se usa en el presente documento, se refiere al esporocarpo seco de las especies de hongos *Ganoderma lucidum* (Leyss.ex Fr.) Karst. o *Ganoderma sinense* Zhao, Xu y Zhang de la familia *Polyporaceae*. Tiene un sabor dulce y una naturaleza simple, participa en los canales del corazón, pulmón, hígado y riñón, y tiene los efectos de una fuerza física nutritiva, y de calmar y tranquilizar la mente. La expresión "*Radix et rhizoma ginseng*", como se usa en el presente documento, se refiere a la raíz y al rizoma secos de la especie vegetal *Panax ginseng* C. A. Mey. de la familia *Araliaceae*. Pueden ser varios tipos de ginseng, tales como ginseng cultivado, ginseng silvestre, ginseng fresco seco, ginseng silvestre fresco seco, ginseng procesado con azúcar y ginseng rojo. La expresión "*Folium ginseng*" se refiere a las hojas secas de la especie vegetal *Panax ginseng* C. A. Mey. de la familia *Araliaceae*. La expresión "*Radix panacis quinquefolii*", como se usa en el presente documento, también conocido como ginseng americano, *huaqishen*, *yangshen*, o *guangdongshen*, se refiere a la raíz seca de la especie vegetal *Panax quinquefolium* L. de la familia *Araliaceae*. Tiene un sabor dulce y ligeramente amargo, y una naturaleza fresca, participa en los canales del corazón, los pulmones y los riñones, y tiene los efectos de vigorizar el Qi, nutrir el Yin, eliminar el calor y potenciar la producción de fluidos. El término "*Cordyceps*", como se usa en el presente documento, se refiere a un complejo seco de un cuerpo muerto de una larva de insecto de la familia *Hepialidae* y a un estroma de la especie de hongo *Cordyceps sinensis* (Berk.) sacc. de la familia *Clavicipitaceae* que parasita en la larva.

La expresión "*Cordyceps sinensis*", como se usa en el presente documento, se refiere a un producto de cepas que se aislaron originalmente del *Cordyceps* natural de *Cordyceps sinensis* (Berk.) sacc. y que se han cultivado en condiciones de fermentación, donde las cepas pueden ser una de *Paecilomyces hepialii* Chen y Dai, sp. nov., *Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu y Zeng, sp. nov., *Cephalosporium sinensis* Chen sp. nov., *Mortierella hepialid* C. T. y B. liu, *Paecilomyces sinensis* Chen, Xiao y Shi, sp. nov., *Tolyposcladium sinensis* C. lan Li, *Cephalosporium sinensis* Chen sp. nov., *Scytalidium hepialii* C. L. Li, *Chrysosporium sinensis* Z. Q. liang, *Verticillium sinensis* Wang sp. nov., *Cephalosporium acremonium* Corda, *Icones fungorum*, *Synnematium sinensis* Yin y Shen, *Isaria farinose* (Holmsk.) Fr. *Systema mycologicum*, *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, *Hirsutella hepialid* Chen y Shen, *Sporothrix insectorum* de Hong y H. C. Evans, *Gliocladium roseum* (link) Thom y *Mortierella* sp., o cualquier combinación de los mismos.

La cepa de la que se obtiene *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado de la presente invención es preferentemente una o más de *Paecilomyces hepialli* Chen y Dai, sp. nov, *Mortierella hepialid* C. T. y B. liu, *Synnematium sinensis* Yin y Shen, *Gliocladium roseum* (link) Thom, *Mortierella* sp., *Cephalosporium sinensis* Chen sp. nov o *Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu y Zeng, sp. nov, o cualquier combinación de las mismas.

5 La expresión "*Flos rosae rugosae*", como se usa en el presente documento, se refiere a la yema floral seca de la especie vegetal *Rosa rugosa* Thumb o *Rose rugosacv*. Plena de la familia *Rosaceae*. Tiene un sabor acre, dulce y ligeramente amargo, y una naturaleza cálida, y representa un fármaco de naturaleza cálida. Sus efectos más significativos son activar el flujo de Qi, resolver el estancamiento, armonizar la sangre y aliviar el dolor.

10 La expresión "*Radix codonopsis*" se refiere a la raíz seca de la especie vegetal *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf., *Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) L. T. Shen, o *Codonopsis tangshen* Oliv. de la familia *Campanulaceae*.

15 La expresión "*Radix pseudostellariae*" usada en el presente documento en referencia a la raíz tuberosa seca de la especie vegetal *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax y Hoffm. de la familia *Caryophyllaceae*.

20 La expresión "*Folium ginseng*" se refiere a las hojas secas de la especie vegetal *Panax ginseng* C. A. Mey. de la familia *Araliaceae*.

El término "*Radix astragal*" se refiere a la raíz seca de la especie vegetal *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongholicus* (Bge) Hsiao o *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. de la familia *Fabaceae*.

25 Las esporas de *Ganoderma* en polvo de acuerdo con la presente invención son preferentemente esporas de *Ganoderma* con el esporodermo roto en polvo.

Las esporas de *Ganoderma* en polvo de acuerdo con la presente invención son las células reproductivas sexuales de *Ganoderma*, es decir, basidiosporas en polvo.

30 El aceite de esporas de *Ganoderma* acuerdo con la presente invención es una sustancia lipídica grasa extraída de las esporas de *Ganoderma* en polvo.

35 El método de preparación de la composición de acuerdo con la presente invención comprende: mezclar directamente las materias primas en partes en peso; o mezclar las materias primas en partes en peso y extraerlas con agua y/o alcohol, obteniéndose la composición; o extraer una o más de las materias primas con agua y/o alcohol y usar el extracto como principio activo para preparar la composición.

40 El alcohol de acuerdo con la presente invención es metanol o etanol; el metanol puede estar a una concentración del 5 al 95 %, y el etanol puede estar a una concentración del 5 al 95 %.

Un proceso de preparación de los extractos de agua y/o alcohol de las materias primas para la composición de medicina tradicional china de acuerdo con la presente invención comprende las etapas de:

45 1) pesar los fármacos de medicina tradicional china como las materias primas; y
y 2) extraer las materias primas a reflujo con alcohol o agua, obteniéndose un extracto líquido como principio activo, y añadir agente/s auxiliar/es para preparar diversas formas farmacéuticas.

50 El proceso de preparación de los extractos de agua y/o alcohol de las materias primas para la composición de medicina tradicional china de acuerdo con la presente invención puede comprender las etapas de:

1) pesar los fármacos de medicina tradicional china como las materias primas, añadir metanol o etanol para llevar a cabo la extracción, recuperar el metanol o etanol del líquido de extracción, proporcionándose el Extracto I;
2) evaporar el alcohol de los fármacos residuales, Añadir agua para llevar a cabo la extracción, proporcionándose el Extracto II; y
3) combinar el Extracto I y el Extracto II, llevar a cabo la filtración, concentrar el filtrado a una cantidad apropiada, añadir agente/s auxiliar/es farmacéuticamente convencional/es para preparar una formulación deseada mediante un proceso farmacéuticamente convencional.

60 El proceso de preparación de los extractos de agua y/o alcohol de las materias primas para la composición de medicina tradicional china de acuerdo con la presente invención puede comprender las etapas de:

65 1) preparación de las materias primas: pesar los fármacos de medicina tradicional china como las materias primas;
2) extracción y concentración: remojar en agua las materias primas del fármaco chino procesadas en la etapa 1), luego cocer varias veces mediante calentamiento, combinar los extractos líquidos para llevar a cabo la filtración,

concentrar el filtrado a una cantidad apropiada, enfriar el concentrado y someterlo a centrifugación de alta velocidad para eliminar las impurezas, y reservar el producto hasta su uso;

3) preparación de la formulación: preparar el concentrado obtenido en la etapa 2), solo o junto con uno o varios agentes auxiliares medicinalmente aceptables, obteniéndose una formulación deseada mediante un proceso farmacéuticamente convencional;

donde, en la etapa 2) anterior, las materias primas se remojan durante 20 a 60 minutos, luego se cuecen de 1 a 3 veces mediante calentamiento por la extracción, durando cada decocción de 1 a 2 h y teniendo una cantidad de agua añadida de 6 a 13 veces.

La composición de acuerdo con la presente invención se puede preparar en cualquier forma farmacéutica mediante la adición de un agente auxiliar o excipiente aceptable en productos para el cuidado de la salud, medicamentos o productos.

La forma farmacéutica puede ser una cualquiera de un comprimido, un líquido oral, un gránulo, una cápsula, un electuario, una píldora de goteo, una pastilla, un polvo, una pastilla para chupar, un extracto fluido, un extracto, una inyección y un jarabe.

Para proporcionar una mejor comprensión del espíritu de la presente invención, los experimentos con animales usando la composición farmacéutica hecha de *Ganoderma*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, y a la composición farmacéutica hecha de *Ganoderma*, *Flos rosae rugosae*, *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*, así como los resultados de los mismos, se describen de aquí en adelante para demostrar la eficacia de la composición de la presente invención en la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas, rinitis alérgica, dermatitis alérgica, urticaria y asma alérgico.

De manera similar, la adición de uno cualquiera o más de entre esporas de *Ganoderma* en polvo, aceite de esporas de *Ganoderma*, Ginseng, *Radix pseudostellariae*, *Radix codonopsis* y *Radix astragali*, o cualquiera de sus combinaciones, también puede conducir a las mismas acciones farmacológicas.

Realizaciones detalladas

Ejemplo 1

300 g de *Radix panacis quinquefolii*, 400 g de *Ganoderma*, 67 g de *Cordyceps*, 200 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Paecilomyces hepialli* Chen y Dai, sp. nov) y 300 g de *Flos rosae rugosae* se pesan. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cinco fármacos anteriores en agua durante 1 h, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

Ejemplo 2

300 g de *Radix panacis quinquefolii*, 400 g de *Ganoderma*, 200 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu y Zeng, sp. nov) y 300 g de *Flos rosae rugosae* se pesan. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 20 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. Cada decocción duró 1 h, con una cantidad de agua añadida de 10 veces. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, a continuación, se retiraron las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

Ejemplo 3

2 kg de *Ganoderma*, 1,5 kg de *Radix panacis quinquefolii* y 1 kg de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma* y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se empaparon los tres fármacos anteriores en agua durante 30 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 13 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de agua de 10 veces para

cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos. Se concentró el filtrado, produciéndose una pasta transparente, que luego se secó por pulverización, preparándose un material compuesto en polvo. La composición obtenida, designada Composición 3, se usó en los experimentos de eficacia como se muestra a continuación.

5

Ejemplo 4

4 kg de *Ganoderma*, 3 kg de *Radix panacis quinquefolii* y 0,67 kg de *Cordyceps* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los tres fármacos anteriores en agua durante 30 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 13 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de agua de 10 veces para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos. Se concentró el filtrado, produciéndose una pasta transparente, que luego se secó por pulverización, preparándose un material compuesto en polvo. La composición obtenida, la Composición 4, se usó en los experimentos de eficacia como se muestra a continuación.

10

15

Ejemplo 5

4 kg de *Ganoderma*, 3 kg de *Radix panacis quinquefolii*, 0,67 kg de *Cordyceps* y 2 kg de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*. Se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 30 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 13 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de agua de 10 veces para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos. Se concentró el filtrado, produciéndose una pasta transparente, que luego se secó por pulverización, preparándose un material compuesto en polvo. La composición obtenida, la Composición 5, se usó en los experimentos de eficacia como se muestra a continuación.

20

25

Ejemplo 6

2,0 kg de *Ganoderma*, 1,5 kg de *Radix panacis quinquefolii*, 1,0 kg de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu y Zeng, sp. nov) y 1,5 kg de *Flos rosae rugosae* se pesan. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 30 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 13 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de agua de 10 veces para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos. Se concentró el filtrado, produciéndose una pasta transparente, que luego se secó por pulverización, preparándose un material compuesto en polvo. La composición obtenida, la Composición 6, se usó en los experimentos de eficacia como se muestra a continuación.

30

35

40

Ejemplo 7

1,5 kg de *Radix panacis quinquefolii*, 2,0 kg de *Ganoderma*, 0,33 kg de *Cordyceps* y 1,5 kg de *Flos rosae rugosae* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*. Se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 30 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 13 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de agua de 10 veces para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos. Se concentró el filtrado, produciéndose una pasta transparente, que luego se secó por pulverización, preparándose un material compuesto en polvo. La composición obtenida, la Composición 7, se usó en los experimentos de eficacia como se muestra a continuación.

45

50

Ejemplo 8

2,0 kg de *Ganoderma*, 1,5 kg de *Radix panacis quinquefolii*, 0,33 kg de *Cordyceps*, 1,0 kg de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Paecilomyces hepialli* Chen y Dai, sp. nov) y 1,5 kg de *Flos rosae rugosae* se pesan. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*. Se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela junto con *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado. Se empaparon los cinco fármacos anteriores en agua durante 30 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 13 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de agua de 10 veces para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos. Se concentró el filtrado, produciéndose una pasta transparente, que luego se secó por pulverización, preparándose un material compuesto en polvo. La composición obtenida, la Composición 8, se usó en los experimentos de eficacia como se muestra a continuación.

55

60

Ejemplo 9

65

150 g de *Radix panacis quinquefolii*, 90 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Hirsutella hepialid* Chen y Shen), 120 g de *Cordyceps*, 200 g de *Ganoderma* y 90 g de *Flos rosae rugosae* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 1 h, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, a continuación, se retiraron las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

Ejemplo 10

500 g de *Radix et rhizoma ginseng*, 100 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Synnematium sinensis* Yin y Shen), 500 g de *Ganoderma* y 500 g de *Flos rosae rugosae* se pesaron. Se cortaron en rodajas las *Radix et rhizoma ginseng* y el *Ganoderma*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y la *Flos rosae rugosae* en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 30 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 15 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de agua de 10 veces para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, se retiraron las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

Ejemplo 11

500 g de *Radix panacis quinquefolii*, 100 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Hirsutella sinensis* Liu,Guo,Yu y Zeng, sp. nov), 500 g de *Ganoderma* y 500 g de *Flos rosae rugosae* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y la *Flos rosae rugosae* en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 20 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, a continuación, se retiraron las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

Ejemplo 12

150 g de *Radix panacis quinquefolii*, 120 g de *Cordyceps*, 200 g de *Ganoderma* y 90 g de *Flos rosae rugosae* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*. Se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 40 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, a continuación, se retiraron las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

Ejemplo 13

150 g de *Radix et rhizoma ginseng*, 90 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Gliocladium roseum* (link)Thom), 200 g de *Ganoderma* y 90 g de *Flos rosae rugosae* se pesaron. Se cortaron en rodajas las *Radix et rhizoma ginseng* y el *Ganoderma* y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 1 h, y se cocieron dos veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 15 veces, y la segunda decocción duró 1,5 h, añadiéndose una cantidad de agua de 10 veces. Se combinaron y se filtraron los dos extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, a continuación, se retiraron las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

Ejemplo 14

150 g de *Radix panacis quinquefolii*, 90 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Hirsutella hepialid* Chen y Shen), 120 g de *Cordyceps*, 200 g de *Ganoderma* y 90 g de *Flos rosae rugosae* se pesaron. Se cortaron en rodajas

la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 1 h, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, a continuación, se retiraron las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

10 Ejemplo 15

100 g de *Radix panacis quinquefolii*, 30 g de *Cordyceps*, 200 g de *Ganoderma* y 100 g de *Flos rosae rugosae* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*. Se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 30 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, a continuación, se retiraron las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

Ejemplo 16

150 g de *Radix panacis quinquefolii*, 30 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu y Zeng, sp. nov), 200 g de *Ganoderma* y 100 g de *Flos rosae rugosae* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 1 h, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, a continuación, se retiraron las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

35 Ejemplo 17

90 g de *Radix panacis quinquefolii*, 90 g de *Cordyceps*, 120 g de *Ganoderma* y 60 g de *Flos rosae rugosae* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*. Se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 20 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. Cada decocción duró 1 h, con una cantidad de agua añadida de 10 veces. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, a continuación, se retiraron las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

Ejemplo 18

90 g de *Radix et rhizoma ginseng*, 90 g de *Cordyceps*, 120 g de *Ganoderma* y 60 g de *Flos rosae rugosae* se pesaron. Se cortaron en rodajas las *Radix et rhizoma ginseng* y el *Ganoderma*. Se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 30 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. Cada decocción duró 1 h, con una cantidad de agua añadida de 10 veces. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, a continuación, se retiraron las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

Ejemplo 19

90 g de *Radix panacis quinquefolii*, 60 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Cephalosporium sinensis* Chen sp. nov), 120 g de *Ganoderma* y 60 g de *Flos rosae rugosae* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 20 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. Cada decocción duró 1 h, con una cantidad de agua añadida de 10 veces. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, a

continuación, se retiraron las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

5 Ejemplo 20

300 g de *Radix panacis quinquefolii*, 400 g de *Ganoderma*, 67 g de *Cordyceps* y 300 g de *Flos rosae rugosae* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*. Se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 1 h, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares usados frecuentemente para la elaboración de comprimidos y se mezclaron uniformemente; y se prepararon diversos tipos de comprimidos mediante procesos convencionales de preparación de comprimidos.

20 Ejemplo 21

300 g de *Radix panacis quinquefolii*, 400 g de *Ganoderma*, 200 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Paecilomyces hepialli* Chen y Dai, sp. nov) y 300 g de *Flos rosae rugosae* se pesan. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 20 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. Cada decocción duró 1 h, con una cantidad de agua añadida de 10 veces. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, a continuación, se retiraron las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

30 Ejemplo 22

500 g de *Radix panacis quinquefolii*, 100 g de *Cordyceps*, 500 g de *Ganoderma*, 500 g de *Flos rosae rugosae* y 500 g de esporas de *Ganoderma* en polvo con el esporodermo roto se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*. Se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 20 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 15 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares frecuentemente usados para los comprimidos y esporas de *Ganoderma* en polvo con el esporodermo roto, y se mezcló uniformemente; y se prepararon diversos tipos de comprimidos mediante procesos convencionales de preparación de comprimidos.

45 Ejemplo 23

500 g de *Radix et rhizoma ginseng*, 100 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Paecilomyces sinensis* Chen, Xiao y Shi, sp. nov), 500 g de *Ganoderma*, 500 g de *Flos rosae rugosae* y 500 g de esporas de *Ganoderma* en polvo con el esporodermo roto se pesaron. Se cortaron en rodajas las *Radix et rhizoma ginseng* y el *Ganoderma*, y se dispusieron el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y las esporas de *Ganoderma* en polvo con el esporodermo roto en una bolsa de tela. Se empaparon los cinco fármacos anteriores en agua durante 20 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 15 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de agua de 10 veces para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares usados frecuentemente para la elaboración de gránulos y se mezclaron uniformemente; y se prepararon gránulos mediante procesos convencionales de preparación de comprimidos.

60 Ejemplo 24

150 g de *Radix panacis quinquefolii*, 90 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Tolypocladium sinensis* C. lan Li), 200 g de *Ganoderma*, 90 g de *Flos rosae rugosae* y 150 g de esporas de *Ganoderma* en polvo con el esporodermo roto se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se dispuso el

Cordyceps sinensis en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 20 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 15 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de agua de 10 veces para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares frecuentemente usados para los comprimidos y esporas de *Ganoderma* en polvo, y se mezcló uniformemente; y se prepararon diversos tipos de comprimidos mediante procesos convencionales de preparación de comprimidos.

Ejemplo 25

500 g de *Radix panacis quinquefolii*, 100 g de *Cordyceps*, 500 g de *Ganoderma*, 500 g de *Flos rosae rugosae* y 100 g de aceite de esporas de *Ganoderma* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se pulverizó el *Cordyceps*. Tras la adición de etanol al 80 %, se extrajeron los cuatro fármacos anteriores dos veces a reflujo, durando cada extracción 2 h, y luego se filtraron. Se recuperó el etanol del filtrado líquido hasta que no se pudo percibir ningún olor a etanol. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares frecuentemente usados para las píldoras de goteo y aceite de esporas de *Ganoderma*, y se mezcló uniformemente; y se prepararon píldoras de goteo mediante procesos convencionales para la elaboración de píldoras de goteo.

Ejemplo 26

500 g de *Radix panacis quinquefolii*, 100 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Synnematium sinensis* Yin y Shen), 500 g de *Ganoderma*, 500 g de *Flos rosae rugosae*, 500 g de esporas de *Ganoderma* en polvo con el esporoderma roto, 100 g de aceite de esporas de *Ganoderma* y 100 g de *Folium ginseng* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se empaparon los fármacos anteriores en agua durante 40 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares frecuentemente usados para los gránulos y esporas de *Ganoderma* en polvo con el esporoderma roto, y se mezcló uniformemente; y se prepararon gránulos mediante procesos convencionales de preparación de gránulos.

Ejemplo 27

150 g de *Radix panacis quinquefolii*, 90 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Hirsutella hepialid* Chen y Shen), 200 g de *Ganoderma*, 90 g de *Flos rosae rugosae* y 400 g de *Radix codonopsis* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii*, el *Ganoderma* y la *Radix codonopsis*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se empaparon los cinco fármacos anteriores en agua durante 40 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares usados frecuentemente para la elaboración de comprimidos y se mezclaron uniformemente; y se prepararon diversos tipos de comprimidos mediante procesos convencionales de preparación de comprimidos.

Ejemplo 28

150 g de *Radix panacis quinquefolii*, 120 g de *Cordyceps*, 200 g de *Ganoderma*, 90 g de *Flos rosae rugosae* y 400 g de *Radix astragali* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii*, el *Ganoderma* y la *Radix astragali*. Se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cinco fármacos anteriores en agua durante 20 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 14 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para las pastillas para chupar, y se mezcló uniformemente, preparándose pastillas para chupar mediante procesos convencionales para las pastillas para chupar.

Ejemplo 29

500 g de *Radix panacis quinquefolii*, 50 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Paecilomyces hepialli* Chen y Dai, sp. nov), 50 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu y Zeng, sp. nov),
 5 500 g de *Ganoderma*, 500 g de *Flos rosae rugosae* y 300 g de *Radix codonopsis* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii*, el *Ganoderma* y la *Radix codonopsis*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo en una bolsa de tela. Se empaparon los cinco fármacos anteriores en agua durante 1 h, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el
 10 filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es usados frecuentemente para la elaboración de polvos y se mezclaron uniformemente; y se preparó un polvo mediante procesos convencionales de preparación de polvos.

Ejemplo 30

500 g de *Radix panacis quinquefolii*, 100 g de *Cordyceps*, 500 g de *Ganoderma*, 500 g de *Flos rosae rugosae* y 300 g de *Radix astragali* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii*, el *Ganoderma* y la *Radix astragali*. Se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cinco fármacos anteriores en agua durante 20 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 14 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, a continuación, se retiraron las impurezas del mismo mediante
 20 centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

Ejemplo 31

100 g de *Radix panacis quinquefolii*, 200 g de *Ganoderma*, 30 g de *Cordyceps*, 3 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (Cs-C-Q80 *Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu y Zeng, sp. nov), 100 g de *Flos rosae rugosae* y 100 g de esporas de *Ganoderma* en polvo se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se pulverizó el *Cordyceps* y se dispuso en una bolsa de tela junto con las esporas de *Ganoderma* en polvo. Se empaparon los cinco fármacos anteriores en agua durante 20 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 15 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de agua de 10 veces para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares usados frecuentemente para la elaboración de comprimidos y se mezclaron uniformemente; y se prepararon diversos tipos de comprimidos mediante procesos convencionales de preparación de comprimidos.

Ejemplo 32

100 g de *Radix panacis quinquefolii*, 200 g de *Ganoderma*, 30 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Mortisrslia hepialid* C. T. y B. liu), 100 g de *Flos rosae rugosae* y 100 g de esporas de *Ganoderma* en polvo se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y las esporas de *Ganoderma* en polvo en una bolsa de tela. Se empaparon los cinco fármacos anteriores en agua durante 20 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 15 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de agua de 10 veces para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces
 50 las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares usados frecuentemente para la elaboración de píldoras y se mezclaron uniformemente; y se prepararon diversos tipos de píldoras mediante procesos convencionales de preparación de píldoras.

Ejemplo 33

90 g de *Radix panacis quinquefolii*, 120 g de *Ganoderma*, 90 g de *Cordyceps*, 60 g de *Flos rosae rugosae* y 90 g de aceite de esporas de *Ganoderma* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*. Se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 30 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se

combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares frecuentemente usados para los
5 gránulos y aceite de esporas de *Ganoderma*, y se mezcló uniformemente; y se prepararon gránulos mediante procesos convencionales de preparación de gránulos.

Ejemplo 34

10 100 g de *Radix panacis quinquefolii*, 200 g de *Ganoderma*, 30 g de *Cordyceps*, 100 g de *Flos rosae rugosae* y 200 g de *Radix pseudostellariae* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cinco fármacos anteriores en agua durante 40 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 15 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de
15 agua de 10 veces para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los extractos blandos y se mezcló uniformemente, preparándose un extracto blanco mediante procesos convencionales para la preparación de extractos blandos.

20 Ejemplo 35

100 g de *Radix panacis quinquefolii*, 200 g de *Ganoderma*, 30 g de *Cordyceps*, 100 g de *Flos rosae rugosae* y 200 g de *Folium ginseng* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cinco fármacos anteriores en agua durante
25 40 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 15 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de agua de 10 veces para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, a continuación, se retiraron las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agentes auxiliares frecuentemente usado/s para los
30 jarabes, y se mezcló uniformemente, preparándose un jarabe mediante procesos convencionales para la preparación de jarabes.

Ejemplo 36

35 100 g de *Radix panacis quinquefolii*, 200 g de *Ganoderma*, 30 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Mortierella* sp.), 100 g de *Flos rosae rugosae* y 200 g de *Radix codonopsis* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii*, el *Ganoderma* y la *Radix codonopsis*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se empaparon los cinco fármacos anteriores en agua durante 40 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h
40 cada una, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares usados frecuentemente para la elaboración de comprimidos y se mezclaron uniformemente; y se prepararon diversos tipos de comprimidos mediante procesos convencionales de
45 preparación de comprimidos.

Ejemplo 37

50 100 g de *Radix panacis quinquefolii*, 200 g de *Ganoderma*, 30 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Verticillium sinensis* Wang sp. nov), 100 g de *Flos rosae rugosae* y 200 g de *Radix astragali* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii*, el *Ganoderma* y la *Radix astragali*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se empaparon los cinco fármacos anteriores en agua durante 40 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h
55 cada una, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares usados frecuentemente para la elaboración de cápsulas y se mezclaron uniformemente; y se prepararon cápsulas mediante procesos convencionales de preparación de
60 cápsulas.

Ejemplo 38

65 90 g de *Radix panacis quinquefolii*, 120 g de *Ganoderma*, 30 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Cephalosporium sinensis* Chen sp. nov), 30 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Synnematium sinensis*

Yin y Shen), 60 g de *Flos rosae rugosae* y 60 g de aceite de esporas de *Ganoderma* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y *Ganoderma*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 1 h, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 13 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares frecuentemente usados para las píldoras y aceite de esporas de *Ganoderma*, y se mezcló uniformemente; y se prepararon diversos tipos de píldoras mediante procesos convencionales de preparación de píldoras.

Ejemplo 39

90 g de *Radix panacis quinquefolii*, 120 g de *Ganoderma*, 90 g de *Cordyceps*, 60 g de *Flos rosae rugosae*, 200 g de *Radix astragali* y 10 g de aceite de esporas de *Ganoderma* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii*, el *Ganoderma* y la *Radix astragali*, y se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cinco fármacos anteriores en agua durante 40 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 15 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de agua de 10 veces para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, a continuación, se retiraron las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agentes auxiliares frecuentemente usado/s para los jarabes, y se mezcló uniformemente, preparándose un jarabe mediante procesos convencionales para la preparación de jarabes.

Ejemplo 40

300 g de *Radix panacis quinquefolii*, 400 g de *Ganoderma*, 200 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Scytalidium hepialii* C. L. Li), 300 g de *Flos rosae rugosae* y 400 g de esporas de *Ganoderma* en polvo se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 20 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 15 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de agua de 10 veces para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares frecuentemente usados para los comprimidos y esporas de *Ganoderma* en polvo, y se mezcló uniformemente; y se prepararon diversos tipos de comprimidos mediante procesos convencionales de preparación de comprimidos. Se preparó un líquido oral mediante la adición de agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para la preparación de líquidos orales. La composición obtenida, la Composición 40, se usó en los experimentos de eficacia como se muestra a continuación.

Ejemplo 41

300 g de *Radix panacis quinquefolii*, 400 g de *Ganoderma*, 67 g de *Cordyceps*, 300 g de *Flos rosae rugosae* y 20 g de aceite de esporas de *Ganoderma* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cuatro fármacos anteriores en agua durante 30 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares frecuentemente usados para los gránulos y aceite de esporas de *Ganoderma*, y se mezcló uniformemente; y se prepararon gránulos mediante procesos convencionales de preparación de gránulos.

Ejemplo 42

300 g de *Radix panacis quinquefolii*, 400 g de *Ganoderma*, 200 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Cephalosporium sinensis* Chen sp. nov), 300 g de *Flos rosae rugosae* y 400 g de *Radix pseudostellariae* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Se empaparon los cinco fármacos anteriores en agua durante 40 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h cada una, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta

mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares usados frecuentemente para la elaboración de comprimidos y se mezclaron uniformemente; y se prepararon diversos tipos de comprimidos mediante procesos convencionales de preparación de comprimidos.

5

Ejemplo 43

300 g de *Radix panacis quinquefolii*, 400 g de *Ganoderma*, 67 g de *Cordyceps*, 300 g de *Flos rosae rugosae* y 400 g de *Radix pseudostellariae* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Se empaparon los cinco fármacos anteriores en agua durante 40 min, y se cocieron 3 veces mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, añadiéndose una cantidad de agua de 15 veces, y cada una de las siguientes decocciones duró 1 h, añadiéndose una cantidad de agua de 10 veces para cada decocción. Se combinaron y se filtraron los tres extractos líquidos, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, a continuación, se retiraron las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agentes auxiliares frecuentemente usado/s para los jarabes, y se mezcló uniformemente, preparándose un jarabe mediante procesos convencionales para la preparación de jarabes.

10

15

Ejemplo 44

300 g de *Radix panacis quinquefolii*, 400 g de *Ganoderma*, 100 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Chrysosporium sinensis* Z. Q. liang), 100 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu y Zeng, sp. nov) y 300 g de *Flos rosae rugosae* se pesan. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y *Ganoderma*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Tras la adición de metanol al 5 %, se extrajeron los fármacos dos veces a reflujo, durando cada extracción 1 h. A continuación, se combinaron los extractos líquidos, y se recuperó el metanol, obteniéndose un extracto alcohólico. Entonces, se cocieron los fármacos residuales dos veces en agua mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y la siguiente decocción duró 1 h, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron el extracto alcohólico y los extractos acuosos, y se filtraron, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares usados frecuentemente para la elaboración de gránulos y se mezclaron uniformemente; y se prepararon gránulos mediante procesos convencionales de preparación de gránulos.

20

25

30

35

Ejemplo 45

300 g de *Radix panacis quinquefolii*, 400 g de *Ganoderma*, 67 g de *Cordyceps*, 20 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu y Zeng, sp. nov) y 300 g de *Flos rosae rugosae* se pesan. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Tras la adición de etanol al 75 %, se extrajeron los fármacos durante 2 h a reflujo, y se recuperó el etanol, obteniéndose un extracto alcohólico. Entonces, se cocieron los fármacos residuales tres veces en agua mediante calentamiento, durando cada cocción 2 h. Se combinaron el extracto alcohólico y los extractos acuosos, y se filtraron, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

40

45

Ejemplo 46

300 g de *Radix et rhizoma ginseng*, 400 g de *Ganoderma*, 200 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Cephalosporium acremonium* Corda, *Icones fungorum*), 300 g de *Flos rosae rugosae* y 400 g de *Radix codonopsis* se pesaron. Se cortaron en rodajas los *Radix Et Rhizoma Ginseng*, el *Ganoderma* y la *Radix codonopsis*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Tras la adición de metanol al 95 %, se extrajeron los fármacos dos veces a reflujo, durando cada extracción 1 h. A continuación, se combinaron los extractos líquidos, y se recuperó el metanol, obteniéndose un extracto alcohólico. Entonces, se cocieron los fármacos residuales 3 veces en agua mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron el extracto alcohólico y los extractos acuosos, y se filtraron, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares usados frecuentemente para la elaboración de gránulos y se mezclaron uniformemente; y se prepararon gránulos mediante procesos convencionales de preparación de gránulos.

50

55

60

65

Ejemplo 47

300 g de *Radix et rhizoma ginseng*, 400 g de *Ganoderma*, 200 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Sporothrix insectorum* de Hong y H. C. Evans), 300 g de *Flos rosae rugosae* y 400 g de *Radix codonopsis* se pesaron. Se cortaron en rodajas los *Radix et rhizoma ginseng* y el *Ganoderma*, y se pulverizó el *Cordyceps* y se dispuso en una bolsa de tela. Tras la adición de etanol al 95 %, se extrajeron los fármacos durante 2 h a reflujo, y se recuperó el etanol, obteniéndose un extracto alcohólico. Entonces, se cocieron los fármacos residuales 3 veces en agua mediante calentamiento, durando cada cocción 2 h. Se combinaron el extracto alcohólico y los extractos acuosos, y se filtraron, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

Ejemplo 48

300 g de *Radix et rhizoma ginseng*, 400 g de *Ganoderma*, 67 g de *Cordyceps*, 300 g de *Flos rosae rugosae*, 300 g de esporas *Ganoderma* en polvo y 400 g de *Radix astragali* se pesaron. Se cortaron en rodajas los *Radix et rhizoma ginseng* y el *Ganoderma*, y se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Tras la adición de etanol al 5 %, se extrajeron los fármacos durante 2 h a reflujo, y se recuperó el etanol, obteniéndose un extracto alcohólico. Entonces, se cocieron los fármacos residuales dos veces en agua mediante calentamiento, durando cada cocción 2 h. Se combinaron el extracto alcohólico y los extractos acuosos, y se filtraron, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

Ejemplo 49

300 g de *Radix panacis quinquefolii*, 400 g de *Ganoderma*, 200 g de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado (*Isaria farinose* (Holmsk.) Fr. *Systema mycologicum*), 300 g de *Flos rosae rugosae* y 400 g de *Radix astragali* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se dispuso el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado en una bolsa de tela. Tras la adición de metanol al 95 %, se extrajeron los fármacos dos veces a reflujo durante 2 h, durando cada extracción 1 h. A continuación, se combinaron los extractos líquidos, y se recuperó el metanol, obteniéndose un extracto alcohólico. Entonces, se cocieron los fármacos residuales 3 veces en agua mediante calentamiento. La primera decocción duró 2 h, y las siguientes decocciones duraron 1 h, añadiéndose una cantidad de 10 veces de agua para cada decocción. Se combinaron el extracto alcohólico y los extractos acuosos, y se filtraron, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad. Se preparó una pasta mediante concentración adicional a presión reducida o se formaron partículas finas mediante secado por pulverización; a esto, se añadieron agentes auxiliares usados frecuentemente para la elaboración de gránulos y se mezclaron uniformemente; y se prepararon gránulos mediante procesos convencionales de preparación de gránulos.

Ejemplo 50

300 g de *Radix panacis quinquefolii*, 400 g de *Ganoderma*, 67 g de *Cordyceps*, 300 g de *Flos rosae rugosae* y 90 g de *Folium ginseng* se pesaron. Se cortaron en rodajas la *Radix panacis quinquefolii* y el *Ganoderma*, y se pulverizó el *Cordyceps* y luego se dispuso en una bolsa de tela. Tras la adición de etanol al 5 %, se extrajeron los fármacos durante 2 h a reflujo, y se recuperó el etanol, obteniéndose un extracto alcohólico. Entonces, se cocieron los fármacos residuales 3 veces en agua mediante calentamiento, durando cada cocción 2 h. Se combinaron el extracto alcohólico y los extractos acuosos, y se filtraron, el filtrado líquido se concentró hasta un nivel apropiado, se dejó enfriar el concentrado líquido, y se retiraron entonces las impurezas del mismo mediante centrifugación a alta velocidad, a esto, se añadieron agente/s auxiliar/es frecuentemente usado/s para los líquidos orales, y se mezcló uniformemente, preparándose un líquido oral de 20.000 ml mediante procesos convencionales para los líquidos orales.

Ejemplo 51. Informe de experimentos con animales de la Composición 3 obtenida en el Ejemplo 3 contra la alergia y la dermatitis alérgica**1. Materiales y métodos****1.1 Fuentes de muestras**

El fármaco de ensayo fue la Composición 3 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma* y *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 11,41 g de fármacos brutos totales. Su ingesta diaria recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal.

1.2 Animales de laboratorio

Se proporcionaron ratones Kunming sanos de grado limpio, la mitad de los cuales eran machos y la otra mitad hembras, cada uno de 18 a 22 g, por el Centro de Laboratorios para Animales, Universidad de Medicina Tradicional China de Jiangxi (Número de certificación: SCXK (Jiangxi) 2005-0001). Se proporcionaron ratas SD sanas de grado limpio, la mitad de las cuales eran machos y la otra mitad hembras, por el Centro de Laboratorios para Animales, Universidad de Medicina Tradicional China de Jiangxi (Número de certificación: SCXK (Jiangxi) 2006-0001).

1.3 Reactivos primarios

Ovoalbúmina (OVA) (Sigma, n.º de lote: 025K0594); Evans Blue (EB) (Sinopharm (Grupo) Shanghai Chemical Reagent Co., Ltd., n.º de lote: F20030714); fosfato de histamina, fabricado por Shanghai Biological Reagent Factory, n.º de lote: 909035; 2,4-dinitroclorobenceno, químico puro, fabricado por Guangzhou Chemical Reagent Factory, n.º de lote: 0703428; prednisona, fabricada por Xianju Pharmaceuticals Co. Ltd., n.º de lote: 090678.

1.4 Instrumentos primarios

Balanza electrónica BS110S, fabricada por Sartorius Inc.; centrífuga (Anting, Shanghai); baño de agua termostático digital (Jintan, Zhejiang); perforador (8 mm de diámetro); micropipeta (Gilson, Francia). Microscopio OLYMPUS; controlador de deslizamiento de baño de agua YT-6C (Yaguang Medical Electronics Technology Inc., Xiaogan, Hubei); incubadora/horno PH140A (Shanghai Yiheng Technology Co., Ltd).

2. Métodos experimentales

2.1 Agrupamiento de animales

Se dividieron los animales aleatoriamente en grupos con 10 animales por grupo en función del peso corporal. Se establecieron un grupo de control modelo, grupos de dosis baja, media y alta de la Composición 3 y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona).

2.2 Pauta posológica

La ingesta diaria de la Composición de fármaco 3 de ensayo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para un ratón fue: grupo de dosis baja: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 4,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 12,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 5, 10 y 30 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (17,53 mg de polvo seco/ml, 35,06 mg de polvo seco/ml y 105,18 mg de polvo seco/ml) con agua destilada para llevar a cabo los experimentos.

La ingesta diaria para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (8,765 mg de polvo seco/ml, 17,53 mg de polvo seco/ml y 52,59 mg de polvo seco/ml) con agua destilada para llevar a cabo los experimentos.

2.3 Efecto de la Composición 3 sobre la anafilaxia pasiva (PCA) en ratas causada por la ovoalbúmina

2.3.1 Preparación de antisuero

Se inyectó OVA al 5 % en solución salina fisiológica en una pata trasera de las ratas a 0,2 ml/pata trasera, mientras que se inyectó una vacuna de *Pertussis* por vía intraperitoneal a 0,15 ml/rata. Tras una alimentación normal de 13 días, se extrajo sangre de la cavidad ocular y se centrifugó a 2.000 rpm durante 15 min. Se aisló suero anti-OVA de la misma y se almacenó en un refrigerador a -20 °C hasta su uso.

2.3.2 Establecimiento de modelos de suero anti-ovoalbúmina de rata

Se tomó suero anti-ovoalbúmina y se diluyó a 1:4 o 1:8 con solución salina fisiológica. Se dividieron aleatoriamente 50 ratas SD en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 3, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratas por grupo. El grupo de control modelo recibió agua destilada por vía intragástrica; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 3 recibieron las soluciones de ensayo por vía intragástrica a diferentes concentraciones en un volumen de dosificación de 10 ml/kg; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 14 días consecutivos. El día 15, se afeitó el lomo de las ratas, y se inyectó por vía intradérmica un antisuero diluido en dos puntos de cada lado con 0,1 ml por punto. Tras 48 horas, se inyectó en la vena de la cola de cada rata una solución mixta de 1,0 ml de azul de Evans al 1 % y

de ovoalbúmina al 1 % en solución salina fisiológica. Tras 30 min, se extrajo sangre arterial, se aisló el suero de la misma y se determinó el contenido de histamina mediante el método^[2]. Se sacrificaron las ratas y se invirtió la piel del lomo para medir el diámetro de las manchas de reacción azules con el fin de determinar la diferencia entre los grupos de dosificación y el grupo modelo. Se fijó una muestra del tejido cutáneo de rata con formaldehído neutro, se deshidrató con un gradiente de alcohol, se embebió en parafina y se examinó para determinar la desgranulación de los mastocitos en el tejido [3].

2.3.3 Efecto de la Composición 3 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno

Se dividieron aleatoriamente 50 ratones en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 3, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratones por grupo. Se aplicó una solución al 5 % de 2,4-dinitroclorobenceno en etanol sobre la piel abdominal (afeitada) de los ratones para la sensibilización. Se llevó a cabo la administración intragástrica dos días antes de la sensibilización; el grupo de control modelo recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de agua destilada; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 3 recibieron las soluciones de ensayo correspondientes por vía intragástrica a un volumen de dosis de 0,1 ml/10 g de peso corporal; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 10 días consecutivos. 7 días después de la sensibilización, se aplicó una solución al 1 % de 2,4-dinitroclorobenceno en la oreja derecha, y se sacrificaron los ratones tras 24 horas, y se cortaron ambas orejas a lo largo de la línea de base de la aurícula. Se perforaron discos que tenían un diámetro de 8 mm en la misma posición en ambas orejas, se pesaron con precisión en una balanza electrónica, y se tomó la diferencia de peso entre la oreja izquierda y derecha como el valor de hipersensibilidad retardada.

2.3.4 Efecto de la Composición 3 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular

Se dividieron aleatoriamente 50 ratones en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 3, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratones por grupo. Se llevó a cabo la administración intragástrica a los ratones una vez al día durante 10 días consecutivos. 30 min después de la administración final, se inyectó una solución de dextrano de bajo peso molecular al 0,0125 % a 0,1 g/10 g en la vena de la cola. Se observó y registró el número de eventos de picazón (los eventos de picazón se indicaron al rascarse la cabeza con las patas delanteras, al rascarse el cuerpo con las patas traseras y al morder en varias partes del cuerpo) ocurrido en el transcurso de los 30 min posteriores a la inyección de la solución de dextrano de bajo peso molecular en las venas de la cola de los ratones de cada grupo.

2.3.5 Efecto de la Composición 3 sobre la permeabilidad capilar en ratas Se dividieron aleatoriamente 50 ratas en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 3, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratas por grupo. El grupo de control modelo recibió agua destilada por vía intragástrica; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 3 recibieron las soluciones de ensayo por vía intragástrica a diferentes concentraciones en un volumen de dosificación de 10 ml/kg; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 10 días consecutivos. 1 hora después de la administración final, se inyectó en la zona afeitada (afeitada antes de la administración) del lomo de las ratas por vía intradérmica 1 mg/ml de fosfato de histamina a una dosis de 0,1 ml/rata, y luego se inyectó en la vena de la cola de inmediato una solución acuosa de azul de Evans al 1 % a una dosis de 1 ml/rata. Tras 20 minutos, se sacrificaron los animales por dislocación cervical. Se retiraron cortando las zonas de la piel con manchas azules y se cortaron en trozos pequeños, se empaparon en una solución de 5 ml de acetona:solución salina fisiológica (7:3) durante 48 horas, se centrifugaron, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 610 nm.

2.4 Método estadístico

Los datos experimentales se presentaron en $\bar{X} \pm S$. Se empleó un análisis ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre el grupo de control modelo y los grupos en varias dosis de la Composición 3. $p < 0,05$ se consideró como significativamente diferente. $p < 0,01$ se consideró como muy significativamente diferente.

3. Resultados

3.1 Efecto de la Composición 3 sobre la anafilaxia pasiva en ratas

Los resultados del ensayo se muestran en las Tablas 1 y 2. En comparación con el grupo de control modelo, el grupo de dosis baja de la Composición 3 mostró una tendencia a disminuir el diámetro de las manchas azules en ratas con sensibilidad al suero anti-ovoalbúmina a 1:4 y 1:8, a disminuir la desgranulación de los mastocitos y a disminuir el contenido de histamina en suero, que, sin embargo, no tuvo significación estadística; el grupo de control de prednisona y los grupos de dosis medias y altas de la Composición 3 mostraron un efecto de disminución significativa del diámetro de las manchas azules en ratas sensibilizadas con suero anti-ovoalbúmina a 1:4 y 1:8, reduciéndose la desgranulación de los mastocitos y reduciéndose el contenido de histamina en suero, con una

diferencia estadística significativa o muy significativa. Esto indica que la Composición 3 tuvo un efecto inhibitor significativo sobre la anafilaxia pasiva en ratas.

Tabla 1. Efecto de la Composición 3 sobre el diámetro de las manchas azules de PCA en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Diámetro de manchas azules (mm)	
			1:4	1:8
Grupo de control modelo	0,0	10	16,90 \pm 2,61	10,26 \pm 1,31
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	12,79 \pm 1,88**	7,43 \pm 1,22**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	15,20 \pm 1,44	9,44 \pm 1,20
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	14,15 \pm 2,08*	8,97 \pm 1,33*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	13,32 \pm 2,17**	8,34 \pm 1,15**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

5

Tabla 2. Efecto de la Composición 3 sobre la desgranulación de los mastocitos y el contenido de histamina en suero en ratas PCA ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Desgranulación	Fluorescencia de la histamina (mg/l)
Grupo de control modelo	0,0	10	60,80 \pm 15,64	4,08 \pm 0,93
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	22,54 \pm 11,25**	2,35 \pm 0,65**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	48,42 \pm 13,90	3,39 \pm 0,86
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	42,65 \pm 16,27*	2,97 \pm 0,88*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	35,52 \pm 13,28**	2,62 \pm 0,40**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

3.2 Efecto de la Composición 3 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno

10

Los resultados se muestran en la Tabla 3. En comparación con el grupo de control modelo, el grado de inflamación de los discos auriculares de los ratones disminuyó significativamente en los grupos de la dosis media y alta de Composición 3, lo que indica que la Composición 3 tuvo un buen efecto inhibitor sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por 2,4-dinitroclorobenceno.

15

Tabla 3. Efecto de la Composición 3 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Grado de inflamación de los discos auriculares de ratón (mg)
Grupo de control modelo	0,0	10	6,98 \pm 0,74
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	5,07 \pm 0,59**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	2,0	10	6,30 \pm 0,90
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	4,0	10	6,16 \pm 0,64*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	12,0	10	5,42 \pm 0,80**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

3.3 Efecto de la Composición 3 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular

20

Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 4. En comparación con el grupo de control modelo, el valor de DO disminuyó significativamente en los grupos de ratas de dosis media y alta de Composición 3, lo que indica que la Composición 3 fue significativamente eficaz en disminuir el aumento de la permeabilidad capilar en ratas

25

causado por el fosfato de histamina.

Tabla 4. Efecto de la Composición 3 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Número de eventos de picazón (30 min)
Grupo de control modelo	0,0	10	29,30 ± 6,62
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	18,30 ± 4,62**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	2,0	10	25,52 ± 7,80
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	4,0	10	23,34 ± 5,24*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	12,0	10	20,10 ± 4,47**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

5

3.4 Efecto de la Composición 3 sobre la permeabilidad capilar en ratas

Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 5. En comparación con el grupo de control modelo, el valor de DO disminuyó significativamente en los grupos de ratas de dosis media y alta de Composición 3, lo que indica que la Composición 3 fue significativamente eficaz en disminuir el aumento de la permeabilidad capilar en ratas causado por el fosfato de histamina.

10

Tabla 5. Efecto de la Composición 3 sobre la permeabilidad capilar en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Valor de DO
Grupo de control modelo	0,0	10	0,994 ± 0,142
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	0,750 ± 0,116**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	0,960 ± 0,142
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	0,857 ± 0,135*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	0,780 ± 0,127**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

15

4. Conclusiones

Los estudios experimentales en animales demuestran que la Composición 3 es significativamente eficaz en la inhibición de la anafilaxia pasiva en ratas causada por la ovoalbúmina, que la Composición 3 es eficaz en la inhibición de la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno y que la Composición 3 es significativamente eficaz en reducir el aumento de la permeabilidad capilar en las ratas causado por el fosfato de histamina. Los resultados anteriores indican una buena eficacia de la Composición 3 para resistir las alergias, y para prevenir y tratar enfermedades alérgicas tales como la dermatitis alérgica y la urticaria.

20

Ejemplo 52. Informe de experimentos con animales de la Composición 3 obtenida en el Ejemplo 3 contra la prevención y el tratamiento de la rinitis alérgica

25

1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

30

El fármaco de ensayo fue la Composición 3 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma* y *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 11,41 g de fármacos brutos totales.

35

1.2 Animales de laboratorio

Se proporcionaron ratas SD de grado limpio, la mitad de las cuales eran machos y la otra mitad hembras, cada una de 180 a 220 g, por el Centro de Laboratorios para Animales, Universidad de Medicina Tradicional China de Jiangxi (Número de certificación: SCXK (Jiangxi) 2006-0001). Se proporcionaron cobayas, la mitad de las cuales eran machos y la otra mitad hembras, cada una de 250 a 300 g, por el Departamento de Servicios Experimentales con Animales de Dongchuang, Distrito de Kaifu, Changsha.

40

1.3 Reactivos primarios

5 Tolilen-2,4-diisocianato (TDI) (Shanghai First Reagent Factory, n.º de lote: 090301); Ovoalbúmina (OVA) (Sigma, n.º de lote: 025K0594); Comprimidos Bi-yan-kang (Foshan Dezhong Pharmaceutical Co., Ltd., n.º de lote: 090701); kits de AMPc y GMPc (Great Wall Biochemicals).

1.4 Instrumentos primarios

10 Analizador de sangre bioquímico automático Beckman-CX7; Microscopio OLYMPUS; Microscopio digital de contraste de fase de fluorescencia invertida TE2000-S (Nikon Inc., Japón); microtomo (Leica, Alemania); controlador de deslizamiento de baño de agua YT-6C (Yaguang Medical Electronics Technology Inc., Xiaogan, Hubei).

2. Métodos experimentales

15 2.1 Efecto sobre la rinitis alérgica en ratas causada por la OVA

2.1.1 Agrupamiento de animales

20 Se dividieron aleatoriamente ratas en dos grupos, es decir, un grupo de control en blanco de 10 animales y un grupo de modelización de 70 animales. Tras una modelización exitosa, las ratas se dividieron aleatoriamente, en función de su puntuación, en los siguientes grupos: un grupo de control modelo, un grupo de positivo de fármaco (grupo de Bi-yan-kang) y los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 3, con 10 animales en cada grupo.

2.1.2 Pauta posológica

25 La ingesta diaria del material compuesto de la Composición de fármaco 3 de ensayo en polvo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 30 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. El volumen de administración intragástrica se calculó como 1,0 ml/100 g de peso corporal. El grupo de control en blanco y el grupo modelo de rinitis alérgica recibieron por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica; el grupo de Bi-yan-kang recibió el fármaco a una dosis de 410 mg/kg. La administración intragástrica se inició después de una modelización exitosa y se llevó a cabo una vez al día durante 21 días consecutivos.

35 2.1.3 Establecimiento de modelos animales de rinitis alérgica en ratas

40 Se añadió 1 ml de solución salina fisiológica a 0,3 mg de OVA como antígeno^[1] y 30 mg de hidróxido de aluminio en polvo como adyuvante para preparar una suspensión, que se inyectó por vía intraperitoneal una vez cada dos días, 7 veces en total. Posteriormente, se realizó una inmunización local en cada cavidad nasal con 10 µl de OVA al 5 % una vez al día durante 7 días. Se administró un volumen equivalente de solución salina fisiológica al grupo de control en blanco. Durante la administración del fármaco de ensayo, se siguió con la administración nasal de 50 µl de OVA al 1 % en días alternos.

45 Criterios de evaluación para la eficacia de la modelización: la eficacia se evaluó mediante puntuación; durante una observación de 30 min después de la exposición, se registraron los momentos de estornudo, el nivel de picazón nasal y la cantidad de secreción nasal. Los criterios de puntuación se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Criterios de puntuación para los síntomas de la rinitis alérgica

Puntuación de los síntomas (puntos)	Momentos de estornudo	Nivel de la picazón nasal	Moco nasal
1	1~3	Rascado ligero de la nariz	Llegando a la abertura nasal anterior
2	4~10	Rascado frecuente de la nariz	Más allá de la abertura nasal anterior
3	superior a 10	Rascado continuo de la nariz	Por toda la cara

50 Una puntuación total de 5 puntos indicó una modelización exitosa, Tras lo que se prosiguió con la administración nasal hasta que se completó el experimento de tratamiento.

2.1.4 Indicadores de ensayo

55 Se midieron los niveles de AMPc y GMPc en sangre, y se realizó un recuento de los mastocitos en los tejidos de la mucosa nasal.

2.1.4.1 Medición del AMPc y GMPc en sangre

60 Se extrajo sangre de la arteria carótida, y se aisló el suero mediante ELISA.

2.1.4.2 Recuento de mastocitos de la mucosa nasal

Se despegó la piel de la zona maxilar nasal, se separó el maxilar del cráneo y se diseccionó a lo largo de la mediana nasal para dejar el tabique nasal y las cavidades nasales de ambos lados al descubierto. Se cortó la sección anterior y media del tabique nasal y se fijó en una solución de formaldehído al 10 % durante 72 h, luego se colocó en una solución de descalcificación para descalcificarse durante 3 días, se deshidrató con un gradiente de alcohol hasta la claridad y se embebió en parafina. Se realizaron cortes convencionales de 4 µm y se tiñeron con azul de toluidina, y se observaron bajo un microscopio para realizar el número total de mastocitos de la muestra.

2.2 Efecto sobre la rinitis alérgica en cobayas causada por TDI

2.2.1. Igual que en 2.1.1.

2.2.2. Igual que en 2.1.2.

2.2.3 Establecimiento de modelos animales de rinitis alérgica en cobaya

La modelización se llevó a cabo con TDI. Las cobayas distintas de las del grupo de control en blanco se modelizaron usando un TDI al 10 %. Se pipetearon 10 µl gota a gota en ambas cavidades nasales de las cobayas (5 µl por cada lado) una vez al día durante 7 días consecutivos, para establecer modelos animales de rinitis alérgica en cobayas^[1]. Se administró por vía nasal un volumen equivalente de aceite de oliva al grupo de control en blanco. Se prosiguió con la administración nasal hasta que se completó el experimento de tratamiento.

Criterios de evaluación para la eficacia de la modelización: la eficacia se evaluó mediante puntuación; durante una observación de 30 min después de la exposición, se registraron los momentos de estornudo, el nivel de picazón nasal y la cantidad de secreción nasal. Los criterios de puntuación se muestran en la Tabla 1.

2.2.4 Indicadores de ensayo

Observación del comportamiento; recuento de eosinófilos en la secreción nasal; mediciones de IgE en suero total e histamina en sangre; medición del espesor de la mucosa nasal.

2.2.4.1 Observación del comportamiento de las cobayas

Tras la exposición a la administración nasal de TDI, se proporcionaron las puntuaciones de acuerdo con los criterios de la Tabla 1.

2.2.4.2 Recuento de eosinófilos (EOS) en la secreción nasal

Se preparó un frotis de secreción nasal de cobayas en un portaobjetos, y se mejoró de acuerdo con el método de Loren^[2]. Los EOS aparentes se hicieron visibles en el campo con 40 aumentos bajo el microscopio digital, y se realizó el recuento del número de EOS de la lámina propia de este sitio en de 3 a 5 campos de alta potencia, y se usó para indicar el grado de infiltración de los EOS.

2.2.4.3 Medición de IgE en suero total e histamina en sangre

Un día después de completarse la administración, se anestesiaron las cobayas con hidrato de cloral al 10 % y se extrajo sangre de la aorta abdominal. Se midió la IgE en suero total mediante radioinmunoensayo. Se añadieron otros 5 ml de sangre en un tubo anticoagulante y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Se extrajo histamina, y se determinó el contenido de histamina mediante espectrofotometría de fluorescencia^[3]. La ecuación para el cálculo fue la siguiente:

$$\text{Contenido de histamina en sangre (mg/l)} = [(\text{valor de la muestra} - \text{valor de la muestra en blanco}) / (\text{valor del patrón} - \text{valor del patrón en blanco})] \times \text{concentración de histamina del patrón}$$

(La concentración de histamina del patrón fue de 50,2 mg · l⁻¹).

2.2.4.4 Medición del espesor de la mucosa nasal

La recogida de material y el corte fueron los mismos que en el Experimento 2.1.4.2. Tras la tinción con HE, se midió cuantitativamente el espesor de la mucosa nasal con un analizador de imágenes. Se determinó la distancia desde el vértice de las protuberancias de la mucosa de la superficie de la mucosa cubierta por el epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado hasta el cartílago del tabique nasal (incluyendo la capa epitelial y la lámina propia) de cada muestra como el espesor de la mucosa.

2.3 Método estadístico

Los datos experimentales se presentaron en $\bar{X} \pm S$. Se empleó un análisis ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre el grupo de control en blanco, el grupo de control modelo y los grupos en varias dosis de la Composición 3. $p < 0,05$ se consideró como significativamente diferente. $p < 0,01$ se consideró como muy significativamente diferente.

3. Resultados

3.1 Efecto de la Composición 3 sobre la rinitis alérgica en ratas causada por la ovoalbúmina

3.1.1 Efecto sobre el comportamiento de las ratas

Los resultados se muestran en la Tabla 2. Tras la modelización, se puntuaron los signos de las ratas de cada grupo modelizado sin que hubiera una diferencia significativa entre los mismos, lo que indicó una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, todas las puntuaciones de los signos de los grupos de dosis medias y altas del fármaco de ensayo y del grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$) y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

Tabla 2. Efecto de la Composición 3 sobre las puntuaciones de los síntomas de la rinitis alérgica en ratas antes y después de la dosificación ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación		
				Día 7	Día 14	Día 21
Grupo de control en blanco	10	-	0,28 ± 0,31	0,39 ± 0,30	0,37 ± 0,25	0,35 ± 0,21
Grupo de control modelo	10	-	6,91 ± 1,80**	6,73 ± 1,49**	7,04 ± 1,72**	6,96 ± 1,49**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	7,20 ± 1,47**	3,49 ± 1,03 ^{ΔΔ}	3,81 ± 1,20 ^{ΔΔ}	3,41 ± 1,20 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	6,91 ± 1,25**	5,79 ± 1,02	6,28 ± 1,39	5,87 ± 1,30
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	7,26 ± 1,68**	5,36 ± 1,19 ^Δ	5,51 ± 1,40 ^Δ	3,97 ± 1,35 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	7,05 ± 1,50**	4,09 ± 1,07 ^{ΔΔ}	3,85 ± 1,29 ^{ΔΔ}	3,55 ± 1,13 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo de control en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.1.2 Efecto de la Composición 3 sobre los niveles de AMPc y GMPc en suero en ratas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. En comparación con el grupo de control en blanco, el grupo modelo mostró una significativa disminución del nivel de AMPc en suero ($p < 0,01$) y un nivel significativamente aumentado de GMPc en suero ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, el grupo de Bi-yan-kang y todos los grupos de fármaco de ensayo mostraron un nivel de AMPc en suero significativamente aumentado ($p < 0,01$ o $p < 0,05$); el grupo de Bi-yan-kang y los grupos de dosis media y alta del fármaco de ensayo mostraron un nivel de GMPc en suero significativamente reducido ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

3.1.3 Efecto de la Composición 3 sobre los mastocitos en la mucosa nasal de rata

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. El número de mastocitos de la mucosa nasal en el grupo de control modelo aumentó significativamente con una diferencia altamente significativa ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, el número de mastocitos de la mucosa nasal en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con el fármaco de ensayo disminuyó significativamente con una diferencia significativa ($p < 0,01$).

Tabla 3. Efecto de la Composición 3 sobre los niveles de AMPc y GMPc en suero y de los mastocitos de la mucosa nasal en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	AMPc (pmol/ml)	GMPc (pmol/ml)	Recuento de mastocitos (células)
Grupo de control en blanco	-	10	20,85 ± 4,87	9,45 ± 2,31	1,59 ± 1,25
Grupo de control modelo	-	10	10,96 ± 3,82**	14,31 ± 4,57**	13,82 ± 4,67**
Grupo de Bi-yan-kang	0,41	10	17,30 ± 3,51 ^{ΔΔ}	9,51 ± 2,32 ^{ΔΔ}	5,78 ± 2,18 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	14,45 ± 3,79	12,98 ± 3,81	8,56 ± 3,22 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	15,37 ± 5,21	10,56 ± 2,72 ^Δ	7,87 ± 3,45 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	17,81 ± 4,22 ^{ΔΔ}	9,22 ± 3,76 ^{ΔΔ}	6,14 ± 2,23 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2 Efecto de la Composición 3 sobre la rinitis alérgica en cobayas causada por TDI

5

3.2.1 Efecto sobre el comportamiento de las cobayas

Los resultados se muestran en la Tabla 4. Tras la modelización, se puntuaron los signos de las cobayas de cada grupo modelizado sin que hubiera una diferencia significativa entre los mismos, lo que indicó una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, todas las puntuaciones de los signos de los grupos de dosis medias y altas del fármaco de ensayo y del grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$) y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

10

Tabla 4. Efecto de la Composición 3 sobre las puntuaciones de los síntomas de la rinitis alérgica en cobayas antes y después de la dosificación ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación		
				Día 7	Día 14	Día 21
Grupo de control en blanco	10	-	0,45 ± 0,28	0,47 ± 0,29	0,42 ± 0,21	0,35 ± 0,24
Grupo de control modelo	10	-	6,78 ± 1,72**	6,67 ± 1,27**	6,73 ± 1,12**	6,40 ± 0,96**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	6,53 ± 1,59**	5,64 ± 0,96 ^Δ	5,48 ± 0,82 ^Δ	4,87 ± 1,28 ^Δ
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	6,34 ± 1,60**	6,20 ± 1,25	6,15 ± 0,98	5,33 ± 1,22
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	6,82 ± 1,87**	5,83 ± 1,38 ^Δ	5,76 ± 1,32 ^{ΔΔ}	4,90 ± 0,76 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	6,79 ± 1,73**	5,76 ± 1,17 ^{ΔΔ}	5,53 ± 0,84 ^{ΔΔ}	4,89 ± 0,93 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.2 Efecto de la histamina en sangre y de la IgE en suero total en cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5. En comparación con el grupo de control en blanco, aumentaron tanto la histamina en sangre como la IgE en suero total en el grupo modelo ($p < 0,01$), indicando una modelización experimental exitosa. En comparación con el grupo modelo, la absorbancia de la fluorescencia de la histamina y la concentración total de IgE en suero en los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo y en el grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), donde la histamina en los grupos de dosis media y alta disminuyó casi hasta el nivel normal, lo que indica que la Composición 3 fue eficaz en el tratamiento de la rinitis alérgica mediante la inhibición del nivel de histamina en sangre y de IgE en suero.

20

25

Tabla 5. Efecto de la Composición 3 sobre la histamina en sangre y de la IgE en suero total en cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Fluorescencia de la histamina (mg/l)	IgE (UI·ml ⁻¹)
Grupo de control en blanco	10	-	2,29 ± 0,48	0,132 ± 0,025
Grupo de control modelo	10	-	3,16 ± 0,89**	0,172 ± 0,032**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	2,14 ± 0,54 ^{ΔΔ}	0,128 ± 0,025 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	3,04 ± 0,44	0,165 ± 0,027
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	2,62 ± 0,42 ^Δ	0,143 ± 0,027 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	2,39 ± 0,38 ^{ΔΔ}	0,136 ± 0,021 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.3 Efecto sobre los eosinófilos (EOS) en la secreción nasal de cobayas

- 5 Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. El número de eosinófilos en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el número de eosinófilos en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con el fármaco disminuyó significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$).

3.2.4 Efecto sobre el espesor de la mucosa nasal en cobayas

- 10 Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. Como resultado, en comparación con el grupo de control en blanco, en el grupo modelo, se separó en diversos grados el epitelio de la mucosa sobre el tabique nasal de las cobayas, teniendo un espesor no uniforme y una estructura basal poco clara; las vénulas y los capilares de la lámina propia mostraron una aparente dilatación, el espacio tisular se expandió, y el espesor de la mucosa aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, los cambios patológicos anteriores en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con fármaco se aliviaron, y el espesor de la mucosa disminuyó significativamente ($p < 0,01$).

20 Tabla 6. Efecto de la Composición 3 sobre los EOS en la secreción nasal y en el espesor de la mucosa nasal en cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Número de EOS ($\times 10^9/l$)	Espesor de la mucosa (mm)
Grupo de control en blanco	-	10	2,77 ± 1,27	0,162 ± 0,054
Grupo de control modelo	-	10	17,67 ± 4,08**	0,295 ± 0,069**
Grupo de Bi-yan-kang	0,41	10	9,30 ± 3,67 ^{ΔΔ}	0,196 ± 0,051 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	11,08 ± 4,01 ^{ΔΔ}	0,235 ± 0,052 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	10,42 ± 3,46 ^{ΔΔ}	0,216 ± 0,056 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	9,54 ± 2,76 ^{ΔΔ}	0,207 ± 0,072 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

4. Conclusiones

- 25 Los estudios experimentales con animales demuestran que la eficacia de la Composición 3 se refleja principalmente en los siguientes aspectos: 1) es capaz de disminuir significativamente la puntuación de los síntomas nasales de las ratas modelizadas, aumentando el nivel de AMPc en suero y reduciendo el nivel de GMPc en ratas con rinitis alérgica; 2) reduce el número de mastocitos en la mucosa nasal de las ratas y reduce su infiltración en las zonas inflamadas; 3) es capaz de disminuir la puntuación de los síntomas nasales de las cobayas modelizadas; 4) disminuye el número de EOS en la secreción nasal de las cobayas y reduce la infiltración de los EOS en las zonas inflamadas; 5) es capaz de disminuir significativamente la concentración de histamina en sangre en las cobayas y de reducir los mediadores inflamatorios; 6) alivia la inflamación de la mucosa nasal de las cobayas. De acuerdo con los resultados de los estudios experimentales, se considera que la Composición 3 es eficaz para resistir la rinitis alérgica.

Ejemplo 53. Informe de experimentos con animales de la Composición 3 obtenida en el Ejemplo 3 contra la prevención y el tratamiento del asma alérgico

1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

El fármaco de ensayo fue la Composición 3 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma* y *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 11,41 g de fármacos brutos totales.

1.2 Animales de laboratorio

Se proporcionaron ratas SD, la mitad de las cuales eran machos y la otra mitad hembras, cada una de 180 a 220 g, por el Centro de Laboratorios para Animales, Universidad de Medicina Tradicional China de Jiangxi (SCXK (Jiangxi) 2006-0001). Se proporcionaron cobayas, la mitad de las cuales eran machos y la otra mitad hembras, cada una de 180 a 220 g, por el Departamento de Servicios Científicos Experimentales con Animales de Dongchuang, Distrito de Kaifu, Changsha, Provincia de Hunan (Número de certificación: SCXK (Hunan) 2006-0001).

1.3 Reactivos primarios

Ovoalbúmina (OVA) (Sigma, n.º de lote: 025K0594); Cloruro de acetilcolina (Shanghai Jingchun Reagent Co., Ltd., n.º de lote: 21205); fosfato de histamina (Shanghai Jingchun Reagent Co., Ltd., n.º de lote: 22270); dexametasona (Zhengzhou Zhuofeng Pharmaceuticals, n.º de lote: 0904213); kits de ELISA de IL-4 e IFN- γ (Great Wall Biochemicals).

1.4 Instrumentos primarios

Sistema de análisis y adquisición de señales biológicas MD3000 (Huaibeizhenghua Bioinstrumentation Co., Ltd.); transductor respiratorio ZH-100 (Huaibeizhenghua Bioinstrumentation Co., Ltd.); atomizador ultrasónico 402A1 (Jiangsu Juyue Medical Device Co., Ltd.); Microscopio OLYMPUS; Microscopio digital de contraste de fase de fluorescencia invertida TE2000-S (Nikon Inc., Japón); microtomo (Leica, Alemania).

2. Métodos experimentales

2.1 Efecto sobre el asma alérgico en ratas causado por la OVA

2.1.1 Agrupamiento de animales

Las ratas (la mitad de las cuales era machos y la otra mitad era hembras) se dividieron aleatoriamente en dos grupos, es decir, un grupo de control en blanco de 10 animales y un grupo de modelización de 70 animales. Tras una modelización exitosa, las ratas se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos: un grupo de control modelo, un grupo positivo de fármaco (grupo de dexametasona) y los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 3, con 10 animales en cada grupo.

2.1.2 Establecimiento de modelos animales de asma alérgico en ratas

El día 1, todos los animales excepto los del grupo de control en blanco se sensibilizaron mediante inyección intraperitoneal con 1 ml de suspensión que contenía 10 mg de OVA, 200 mg de Al(OH)₃ en polvo seco, y 6 x 10⁹ vacunas de *Pertussis* inactivadas en solución salina fisiológica, y se sensibilizaron una vez más el día 8. A partir del día 15, se expusieron todos los grupos de animales, excepto el grupo de control en blanco, a OVA al 1 % atomizada por ultrasonidos durante aproximadamente 20 min cada vez, de 8 a 9 de la mañana todos los días, hasta que las ratas mostraron episodios asmáticos, que duraron 3 semanas. Durante la exposición a la atomización, las ratas mostraron síntomas tales como agitación, estornudos, incontinencia urinaria y fecal, rascado de las orejas y cianosis, lo que sugiere una replicación exitosa del modelo de asma.

2.1.3 Pauta posológica

La ingesta diaria del material compuesto de la Composición de fármaco 3 de ensayo en polvo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (8,76 mg de polvo seco/ml, 17,52 mg de polvo seco/ml, 52,56 mg de polvo seco/ml) para llevar a cabo los experimentos. El volumen de administración intragástrica se calculó como 1,0 ml/100 g de peso corporal. el grupo de control modelo recibió por vía intragástrica un volumen

equivalente de solución salina fisiológica al 0,9 % 30 min antes de la exposición; y el grupo de fármaco positivo recibió dexametasona a una dosis de 0,5 mg/kg 30 min antes de cada desafío^[2]. Los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 3 recibieron cada uno por vía intragástrica la dosis respectiva del fármaco de ensayo 30 min antes de cada exposición. Al mismo tiempo, el grupo de control en blanco recibió por inyección intraperitoneal, se expuso a la atomización con o recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica al 0,9 %. La administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 21 días consecutivos.

2.1.4 Registro del período latente del asma inducido en ratas

Se fijó un transductor respiratorio ZH-100 alrededor de la caja torácica de cada rata (la tensión se ajustó a de aproximadamente 1 a 2 g de modo que la amplitud de la onda respiratoria fuera de 1 a 2 mv). Se conectó el transductor a un sistema de análisis y adquisición de señales biológicas MD3000. Se dispusieron los animales en una campana de vidrio cerrada conectada a un atomizador ultrasónico. Se encendió el sistema de adquisición, y se registró un segmento de onda respiratoria normal. Luego se aplicó la atomización ultrasónica con OVA al 1 % durante 20 min, y se registraron las ondas respiratorias del asma inducido en las ratas de manera continua durante 30 min tras iniciarse la atomización. Al mismo tiempo, se observó a simple vista el período desde el inicio de la atomización hasta la aparición de los síntomas (indicado por la primera contracción), y se registró como el período latente del asma.

2.1.5 Mediciones de los niveles de IL-4 e IFN- γ

24 h después de la exposición final, las ratas se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal con pentobarbital sódico al 3 % (30 mg/kg). Se extrajeron de 5 a 10 ml de sangre, y se midieron los niveles de IL-4 e IFN- γ en sangre mediante ELISA.

2.1.6 Medición del contenido de EOS en los tejidos pulmonares

Se cortaron los tejidos del pulmón izquierdo y se fijaron en poliformaldehído al 4 % durante de 4 a 5 h, después se lavaron con agua, se deshidrataron con un gradiente de alcohol, y se sumergieron y embebidos en parafina. Se realizó la tinción con HE con un proceso de corte sucesivo, se observaron cambios inflamatorios en los tejidos y se contó la infiltración de los EOS. Para cada sección, un mismo observador escogió aleatoriamente 10 campos bajo un microscopio de gran aumento (400 aumentos), y se calcularon los números de EOS infiltrados alrededor de los bronquios y de los vasos, calculándose la media como el valor representativo para esta sección.

2.2 Efecto sobre el asma alérgico en cobayas causado por un gas mixto de Ach e His

2.2.1 Igual que en 2.1.1.

2.2.2 Establecimiento de modelos animales de asma alérgico en cobayas

El día 1, Se dispusieron las cobayas en una campana de vidrio cerrada de 4 l, en la que se pulverizó una solución de mezcla a 1:1 de Ach al 2 % e His al 0,4 % por atomización ultrasónica durante 15 s. Una vez completada la pulverización, se registró el período latente de asma inducido en los cobayas (es decir, el período desde el final de la pulverización hasta los ataques asmáticos, desde la dificultad extrema para respirar hasta la contracción y la caída). Se excluyeron los animales que tenían un período de asma latente superior a 120 s.

2.2.3 Pauta posológica

Igual que en 2.1.3.

2.2.4 Registro del período latente del asma

Igual que en 2.1.4.1.

2.2.5 Medición de la IgE en suero y de BALF

Se empleó radioinmunoensayo de tipo sándwich de doble anticuerpo.

2.3 Método estadístico

Los datos experimentales se presentaron en $\bar{X} \pm S$. Se empleó un análisis ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre los grupos. $p < 0,05$ se consideró como significativamente diferente. $p < 0,01$ se consideró como muy significativamente diferente.

3. Resultados

3.1 Efecto de la Composición 3 sobre el asma alérgico en ratas causado por la OVA

5 3.1.1 Efecto sobre el período latente del asma inducido en ratas

Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se puntuaron los períodos latentes de asma inducido en ratas de cada grupo modelizado, sin una diferencia significativa entre ellos, lo que indica una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, los períodos latentes de asma inducido en las ratas del grupo de control positivo y los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo se prolongaron significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$).

Tabla 1. Efecto sobre el período latente del asma inducido en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación
Grupo de control en blanco	10	-	360	360
Grupo de control modelo	10	-	76,03 \pm 13,23**	75,62 \pm 11,65**
Grupo de control positivo	10	0,5 mg/kg	75,84 \pm 12,36**	162,61 \pm 17,88 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	76,42 \pm 14,42**	87,15 \pm 19,82
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	75,49 \pm 15,38**	93,56 \pm 21,75 Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	74,07 \pm 17,56**	112,87 \pm 21,78 $\Delta\Delta$

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$ frente al grupo modelo.

15 3.1.2 Efecto sobre los niveles de IL-4 e IFN- γ en ratas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 2. En comparación con el grupo de control en blanco, el grupo modelo mostró una significativa disminución del nivel en suero de IFN- γ ($p < 0,01$), pero un aumento significativo del nivel de IL-4 en suero ($p < 0,01$), lo que indica un grave desequilibrio de la proporción de IFN- γ /IL-4 durante los ataques de asma. En comparación con el grupo modelo, el grupo de dexametasona y los grupos de dosis media y alta del fármaco de ensayo mostraron un nivel de IL-4 significativamente reducido ($p < 0,05$ o $p < 0,01$) y un nivel de IFN- γ significativamente mayor ($p < 0,05$ o $p < 0,01$), lo que indica que el fármaco de ensayo puede corregir la proporción desequilibrada de IFN- γ /IL-4.

Tabla 2. Efecto de la Composición 3 sobre los niveles de IL-4 e IFN- γ en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	IL-4 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
Grupo de control en blanco	-	10	12,33 \pm 2,43	26,35 \pm 4,56
Grupo de control modelo	-	10	23,06 \pm 3,29**	11,52 \pm 3,24**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	12,88 \pm 4,13 $\Delta\Delta$	20,51 \pm 4,65 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	21,07 \pm 3,08	12,83 \pm 3,68
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	18,64 \pm 3,81 Δ	15,24 \pm 3,78 Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	15,94 \pm 3,26 $\Delta\Delta$	18,58 \pm 4,67 $\Delta\Delta$

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.1.3 Efecto sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de rata

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. El número de EOS en ratas en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el grupo de control positivo y los grupos de dosis media y alta de fármaco de ensayo mostraron un número significativamente reducido de EOS ($p < 0,01$), lo que indica que la Composición 3 es eficaz en el tratamiento del asma alérgico, posiblemente al reducir el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de las ratas.

35

Tabla 3. Efecto de la Composición 3 sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de rata ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	EOS (células/HP)
Grupo de control en blanco	-	10	5,76 ± 1,35
Grupo de control modelo	-	10	108,85 ± 12,74**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	27,51 ± 4,31 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	98,21 ± 10,28
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	89,13 ± 9,24 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	67,01 ± 8,57 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2 Efecto de la Composición 3 sobre el asma alérgico en cobayas causado por un gas mixto de Ach e His

5 3.2.1 Efecto sobre el período latente del asma inducido en cobayas

Los resultados se muestran en la Tabla 4. Tras la modelización, se puntuaron los períodos latentes de asma inducido en cobayas de cada grupo modelizado, sin una diferencia significativa entre ellos, lo que indica una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, los períodos latentes de asma inducido en las cobayas del grupo de control positivo y los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo se prolongaron significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$), lo que indica que la Composición 3 aumenta enormemente los síntomas asmáticos en las cobayas.

Tabla 4. Efecto de la Composición 3 sobre el período latente del asma inducido en cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación
Grupo de control en blanco	10	-	360	360
Grupo de control modelo	10	-	74,84 ± 14,6**	77,23 ± 11,61**
Grupo de control positivo	10	0,5 mg/kg	77,32 ± 13,95**	160,92 ± 19,72 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	76,52 ± 14,86**	90,31 ± 19,23
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	75,58 ± 15,37**	94,74 ± 21,68 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	75,18 ± 1534**	113,73 ± 21,91 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

15 3.2.2 Efecto sobre la IgE total en suero y sobre BALF de cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5. El contenido total de IgE en suero y de BALF en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el contenido total de IgE en suero y de BALF en el grupo de dexametasona y en los grupos en dosis media y alta del fármaco de ensayo disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), lo que indica que tanto la dexametasona como el fármaco de ensayo pueden inhibir la respuesta inflamatoria alérgica en el pulmón de cobaya y mejorar los síntomas asmáticos.

Tabla 5. Efecto de la Composición 3 sobre la IgE total en suero y sobre BALF de cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Suero (U/l)	BALF (U/l)
Grupo de control en blanco	-	10	3,02 ± 0,93	3,55 ± 0,87
Grupo de control modelo	-	10	5,47 ± 1,33**	5,32 ± 1,71**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	3,58 ± 1,19 ^{ΔΔ}	3,49 ± 0,82 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	5,24 ± 2,27	4,28 ± 1,44
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	4,15 ± 1,14 ^Δ	3,84 ± 1,42 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	3,85 ± 1,12 ^{ΔΔ}	3,12 ± 0,82 ^{ΔΔ}

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Suero (U/l)	BALF (U/l)
--------	-------------------------------	--------------------	-------------	------------

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.3 Efecto sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares cobayas

5 Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. En comparación con el grupo de control en blanco, el nivel de recuento de EOS en las cobayas del grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el nivel de recuento de EOS en el grupo de control positivo y los grupos de dosis media y alta de fármaco de ensayo se redujo significativamente ($p < 0,01$), lo que indica que la Composición 3 es eficaz en el tratamiento del asma alérgico, posiblemente al reducir el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de las cobayas.

10

Tabla 6. Efecto de la Composición 3 sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	EOS (células/HP)
Grupo de control en blanco	-	10	4,24 ± 2,49
Grupo de control modelo	-	10	97,61 ± 14,82**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	31,78 ± 7,55 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	88,28 ± 12,18
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	77,25 ± 12,14 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	61,24 ± 11,68 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

4. Conclusiones

15 Los estudios experimentales con animales demuestran que la Composición 3 es capaz de mejorar significativamente los síntomas asmáticos en ratas y de prolongar el período de latencia del asma inducido en cobayas en los grupos modelo; de reducir el nivel de IL-4 en suero, de aumentar el nivel de IFN- γ en suero y corregir la proporción desequilibrada de IFN- γ /IL-4 en ratas con asma; de reducir el número de EOS en los tejidos pulmonares de las ratas y cobayas, y mejorar la infiltración de los EOS en las zonas inflamadas; de reducir el contenido total de IgE en suero y de BALF de las cobayas, y mejorar los síntomas inflamatorios pulmonares. Por lo tanto, la Composición 3 se considera eficaz en la resistencia al asma alérgico.

20

Ejemplo 54. Informe de experimentos con animales de la Composición 4 obtenida en el Ejemplo 4 contra la alergia y la dermatitis alérgica

25

1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

30 El fármaco de ensayo fue la Composición 4 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma* y *Cordyceps*) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 10,97 g de fármacos brutos totales. Su ingesta diaria recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal.

1.2 Animales de laboratorio

Igual que en Ejemplo 51.

1.3 Reactivos primarios

40

Igual que en Ejemplo 51.

1.4 Instrumentos primarios

45 Igual que en Ejemplo 51.

2. Métodos experimentales

2.1 Agrupamiento de animales

- 5 Se dividieron los animales aleatoriamente en grupos con 10 animales por grupo en función del peso corporal. Se establecieron un grupo de control modelo, grupos de dosis baja, media y alta de la Composición 4 y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona).

2.2 Pauta posológica

- 10 La ingesta diaria de la Composición de fármaco 4 de ensayo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para un ratón fue: grupo de dosis baja: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 4,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 12,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 5, 10 y 30 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (18,23 mg de polvo seco/ml, 36,46 mg de polvo seco/ml y 109,38 mg de polvo seco/ml) con agua destilada para llevar a cabo los experimentos.

- 20 La ingesta diaria para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (9,12 mg de polvo seco/ml, 18,23 mg de polvo seco/ml y 54,69 mg de polvo seco/ml) con agua destilada para llevar a cabo los experimentos.

- 25 2.3 Efecto de la Composición 4 sobre la anafilaxia pasiva (PCA) en ratas causada por la ovoalbúmina

2.3.1 Preparación de antisuero

- 30 Igual que en Ejemplo 51.

2.3.2 Establecimiento de modelos de suero anti-ovoalbúmina de rata

- 35 Se tomó suero anti-ovoalbúmina y se diluyó a 1:4 o 1:8 con solución salina fisiológica. Se dividieron aleatoriamente 50 ratas en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 4, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratas por grupo. El grupo de control modelo recibió agua destilada por vía intragástrica; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 4 recibieron las soluciones de ensayo por vía intragástrica a diferentes concentraciones en un volumen de dosificación de 10 ml/kg; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 14 días consecutivos. El día 15, se afeitó el lomo de las ratas, y se inyectó por vía intradérmica un antisuero diluido en dos puntos de cada lado con 0,1 ml por punto. Tras 48 horas, se inyectó en la vena de la cola de cada rata una solución mixta de 1,0 ml de azul de Evans al 1 % y de ovoalbúmina al 1 % en solución salina fisiológica. Tras 30 min, se extrajo sangre arterial, se aisló el suero de la misma y se determinó el contenido de histamina mediante el método^[2]. Se sacrificaron las ratas y se invirtió la piel del lomo para medir el diámetro de las manchas de reacción azules con el fin de determinar la diferencia entre los grupos de dosificación y el grupo modelo. Se fijó una muestra del tejido cutáneo de rata con formaldehído neutro, se deshidrató con un gradiente de alcohol, se embebió en parafina y se examinó para determinar la desgranulación de los mastocitos en el tejido^[3].

- 50 2.3.3 Efecto de la Composición 4 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno^[4]

- 55 Se dividieron aleatoriamente 50 ratones en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 4, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratones por grupo. Se aplicó una solución al 5 % de 2,4-dinitroclorobenceno en etanol sobre la piel abdominal (afeitada) de los ratones para la sensibilización. Se llevó a cabo la administración intragástrica dos días antes de la sensibilización; el grupo de control modelo recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de agua destilada; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 4 recibieron las soluciones de ensayo correspondientes por vía intragástrica a un volumen de dosis de 0,1 ml/10 g de peso corporal; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 10 días consecutivos. 7 días después de la sensibilización, se aplicó una solución al 1 % de 2,4-dinitroclorobenceno en la oreja derecha, y se sacrificaron los ratones tras 24 horas, y se cortaron ambas orejas a lo largo de la línea de base de la aurícula. Se perforaron discos que tenían un diámetro de 8 mm en la misma posición en ambas orejas, se pesaron con precisión en una balanza electrónica, y se tomó la diferencia de peso entre la oreja izquierda y derecha como el valor de hipersensibilidad retardada.

65

2.3.4 Efecto de la Composición 4 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular^[5]

Se dividieron aleatoriamente los ratones en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 4, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratones por grupo. Se llevó a cabo la administración intragástrica a los ratones una vez al día durante 10 días consecutivos. 30 min después de la administración final, se inyectó una solución de dextrano de bajo peso molecular al 0,0125 % a 0,1 g/10 g en la vena de la cola. Se observó y registró el número de eventos de picazón (los eventos de picazón se indicaron al rascarse la cabeza con las patas delanteras, al rascarse el cuerpo con las patas traseras y al morder en varias partes del cuerpo) ocurrido en el transcurso de los 30 min posteriores a la inyección de la solución de dextrano de bajo peso molecular en las venas de la cola de los ratones de cada grupo.

2.3.5 Efecto de la Composición 4 sobre la permeabilidad capilar en ratas^[6]

Se dividieron aleatoriamente las ratas en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 4, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratas por grupo. El grupo de control modelo recibió agua destilada por vía intragástrica; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 4 recibieron las soluciones de ensayo por vía intragástrica a diferentes concentraciones en un volumen de dosificación de 10 ml/kg; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 10 días consecutivos. 1 hora después de la administración final, se inyectó en la zona afeitada (afeitada antes de la administración) del lomo de las ratas por vía intradérmica 1 mg/ml de fosfato de histamina a una dosis de 0,1 ml/rata, y luego se inyectó en la vena de la cola de inmediato una solución acuosa de azul de Evans al 1 % a una dosis de 1 ml/rata.

Tras 20 minutos, se sacrificaron los animales por dislocación cervical. Se retiraron cortando las zonas de la piel con manchas azules y se cortaron en trozos pequeños, se empaparon en una solución de 5 ml de acetona:solución salina fisiológica (7:3) durante 48 horas, se centrifugaron, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 610 nm.

2.4 Método estadístico

Los datos experimentales se presentaron en $\bar{X} \pm S$. Se empleó un análisis ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre el grupo de control modelo y los grupos en varias dosis de la Composición 4. $p < 0,05$ se consideró como significativamente diferente. $p < 0,01$ se consideró como muy significativamente diferente.

3. Resultados

3.1 Efecto de la Composición 4 sobre la anafilaxia pasiva en ratas

Los resultados del ensayo se muestran en las Tablas 1 y 2. En comparación con el grupo de control modelo, el grupo de dosis baja de la Composición 4 mostró una tendencia a disminuir el diámetro de las manchas azules en ratas con sensibilidad al suero anti-ovoalbúmina a 1:4 y 1:8, a disminuir la desgranulación de los mastocitos y a disminuir el contenido de histamina en suero, que, sin embargo, no tuvo significación estadística; el grupo de control de prednisona y los grupos de dosis medias y altas de la Composición 4 mostraron un efecto de disminución significativa del diámetro de las manchas azules en ratas sensibilizadas con suero anti-ovoalbúmina a 1:4 y 1:8, reduciéndose la desgranulación de los mastocitos y reduciéndose el contenido de histamina en suero, con una diferencia estadística significativa o muy significativa. Esto indica que la Composición 4 tuvo un efecto inhibitorio significativo sobre la anafilaxia pasiva en ratas.

Tabla 1. Efecto de la Composición 4 sobre el diámetro de las manchas azules de PCA en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Diámetro de manchas azules (mm)	
			1:4	1:8
Grupo de control modelo	0,0	10	17,22 ± 2,57	10,62 ± 2,12
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	11,94 ± 1,90**	7,23 ± 1,60**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	15,68 ± 1,58	9,36 ± 1,48
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	14,80 ± 2,10*	8,50 ± 1,62*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	13,62 ± 2,07**	7,56 ± 1,70**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

Tabla 2. Efecto de la Composición 4 sobre la desgranulación de los mastocitos y el contenido de histamina en suero en ratas PCA ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Desgranulación	Fluorescencia de la histamina (mg/l)
Grupo de control modelo	0,0	10	57,92 ± 9,65	4,17 ± 0,79
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	19,46 ± 8,72**	1,92 ± 0,61**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	49,27 ± 9,05	3,58 ± 0,88
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	46,48 ± 8,27*	3,10 ± 0,92*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	29,31 ± 7,99**	2,62 ± 0,76**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

3.2 Efecto de la Composición 4 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno

Los resultados se muestran en la Tabla 3. En comparación con el grupo de control modelo, el grado de inflamación de los discos auriculares de los ratones disminuyó significativamente en los grupos de la dosis media y alta de Composición 4, lo que indica que la Composición 4 tuvo un buen efecto inhibitorio sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por 2,4-dinitroclorobenceno.

Tabla 3. Efecto de la Composición 4 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Grado de inflamación de los discos auriculares de ratón (mg)
Grupo de control modelo	0,0	10	6,20 ± 0,90
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	4,22 ± 0,96**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	2,0	10	5,62 ± 0,87
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	4,0	10	5,08 ± 0,94*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	12,0	10	4,60 ± 0,80**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

3.3 Efecto de la Composición 4 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular

Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 4. En comparación con el grupo de control modelo, el valor de DO disminuyó significativamente en los grupos de ratas de dosis media y alta de Composición 4, lo que indica que la Composición 4 fue significativamente eficaz en disminuir el aumento de la permeabilidad capilar en ratas causado por el fosfato de histamina.

Tabla 4. Efecto de la Composición 4 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Número de eventos de picazón (30 min)
Grupo de control modelo	0,0	10	34,12 ± 9,54
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	14,25 ± 6,72**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	2,0	10	29,46 ± 8,03
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	4,0	10	22,53 ± 9,50*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	12,0	10	18,12 ± 8,26**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

3.4 Efecto de la Composición 4 sobre la permeabilidad capilar en ratas

Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 5. En comparación con el grupo de control modelo, el valor de DO disminuyó significativamente en los grupos de ratas de dosis media y alta de Composición 4, lo que indica que la Composición 4 fue significativamente eficaz en disminuir el aumento de la permeabilidad capilar en ratas causado por el fosfato de histamina.

Tabla 5. Efecto de la Composición 4 sobre la permeabilidad capilar en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Valor de DO
Grupo de control modelo	0,0	10	0,978 \pm 0,104
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	0,656 \pm 0,088**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	0,924 \pm 0,096
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	0,851 \pm 0,108*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	0,776 \pm 0,122**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

4. Conclusiones

Los estudios experimentales en animales demuestran que la Composición 4 es significativamente eficaz en la inhibición de la anafilaxia pasiva en ratas causada por la ovoalbúmina, que la Composición 4 es eficaz en la inhibición de la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno y que la Composición 4 es significativamente eficaz en reducir el aumento de la permeabilidad capilar en las ratas causado por el fosfato de histamina. Los resultados anteriores indican una buena eficacia de la Composición 4 para resistir las alergias, y para prevenir y tratar enfermedades alérgicas tales como la dermatitis alérgica y la urticaria.

Ejemplo 55. Informe de experimentos con animales de la Composición 4 obtenida en el Ejemplo 4 contra la prevención y el tratamiento de la rinitis alérgica

1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

El fármaco de ensayo fue la Composición 4 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma* y *Cordyceps*) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 10,97 g de fármacos brutos totales.

1.2 Animales de laboratorio

Igual que en Ejemplo 52.

1.3 Reactivos primarios

Igual que en Ejemplo 52.

1.4 Instrumentos primarios

Igual que en Ejemplo 52.

2. Métodos experimentales

2.1 Efecto sobre la rinitis alérgica en ratas causada por la OVA

2.1.1 Agrupamiento de animales

Se dividieron aleatoriamente ratas en dos grupos, es decir, un grupo de control en blanco de 10 animales y un grupo de modelización de 70 animales. Tras una modelización exitosa, las ratas se dividieron aleatoriamente, en función de su puntuación, en los siguientes grupos: un grupo de control modelo, un grupo de positivo de fármaco (grupo de Bi-yan-kang) y los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 4, con 10 animales en cada grupo.

2.1.2 Pauta posológica

La ingesta diaria del material compuesto de la Composición de fármaco 4 de ensayo en polvo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. El volumen de administración intragástrica se calculó como 1,0 ml/100 g de peso corporal. El grupo de control en blanco y el grupo modelo de rinitis alérgica recibieron por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica; el grupo de Bi-yan-kang recibió el fármaco a una dosis de 410 mg/kg. La administración intragástrica se inició después de una modelización exitosa y se llevó a cabo una vez al día durante 21 días consecutivos.

2.1.3 Establecimiento de modelos animales de rinitis alérgica en ratas

Igual que en Ejemplo 52.

2.1.4 Indicadores de ensayo

Igual que en Ejemplo 52.

2.1.4.1 Medición del AMPc y GMPc en sangre

Igual que en Ejemplo 52.

2.1.4.2 Recuento de mastocitos de la mucosa nasal

Igual que en Ejemplo 52.

2.2 Efecto sobre la rinitis alérgica en cobayas causada por TDI

2.2.1. Igual que en 2.1.1.

2.2.2. Igual que en 2.1.2.

2.2.3 Establecimiento de modelos animales de rinitis alérgica en cobaya

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4 Indicadores de ensayo

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.1 Observación del comportamiento de las cobayas

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.2 Recuento de eosinófilos (EOS) en la secreción nasal

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.3 Medición de IgE en suero total e histamina en sangre

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.4 Medición del espesor de la mucosa nasal

Igual que en Ejemplo 52.

2.3 Método estadístico

Los datos experimentales se presentaron en $\bar{X} \pm S$. Se empleó un análisis ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre el grupo de control en blanco, el grupo de control modelo y los grupos en varias dosis de la Composición 4. $p < 0,05$ se consideró como significativamente diferente. $p < 0,01$ se consideró como muy significativamente diferente.

65

3. Resultados

3.1 Efecto de la Composición 4 sobre la rinitis alérgica en ratas causada por la ovoalbúmina

5 3.1.1 Efecto sobre el comportamiento de las ratas

Los resultados se muestran en la Tabla 2. Tras la modelización, se puntuaron los signos de las ratas de cada grupo modelizado sin que hubiera una diferencia significativa entre los mismos, lo que indicó una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, todas las puntuaciones de los signos de los grupos de dosis medias y altas del fármaco de ensayo y del grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$) y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

Tabla 2. Efecto de la Composición 4 sobre las puntuaciones de los síntomas de la rinitis alérgica en ratas antes y después de la dosificación ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación		
				Día 7	Día 14	Día 21
Grupo de control en blanco	10	-	0,35 ± 0,31	0,40 ± 0,22	0,37 ± 0,19	0,33 ± 0,14
Grupo de control modelo	10	-	6,68 ± 1,52**	6,60 ± 1,27**	6,90 ± 1,32**	6,54 ± 1,16**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	6,63 ± 1,24**	3,24 ± 0,96 ^{ΔΔ}	3,67 ± 1,24 ^{ΔΔ}	2,96 ± 0,98 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	6,74 ± 1,15**	5,80 ± 0,85	5,76 ± 1,39	5,61 ± 1,06
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	6,52 ± 1,34**	5,27 ± 1,23 ^Δ	5,29 ± 1,43 ^Δ	4,56 ± 1,45 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	6,69 ± 1,08**	4,66 ± 0,82 ^{ΔΔ}	4,40 ± 1,36 ^{ΔΔ}	4,24 ± 1,33 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo de control en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

15

3.1.2 Efecto de la Composición 4 sobre los niveles de AMPc y GMPc en suero en ratas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. En comparación con el grupo de control en blanco, el grupo modelo mostró una significativa disminución del nivel de AMPc en suero ($p < 0,01$) y un nivel significativamente aumentado de GMPc en suero ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, el grupo de Bi-yan-kang y todos los grupos de fármaco de ensayo mostraron un nivel de AMPc en suero significativamente aumentado ($p < 0,01$ o $p < 0,05$); el grupo de Bi-yan-kang y los grupos de dosis media y alta del fármaco de ensayo mostraron un nivel de GMPc en suero significativamente reducido ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

20

25

3.1.3 Efecto de la Composición 4 sobre los mastocitos en la mucosa nasal de rata

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. El número de mastocitos de la mucosa nasal en el grupo de control modelo aumentó significativamente con una diferencia altamente significativa ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, el número de mastocitos de la mucosa nasal en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con el fármaco de ensayo disminuyó significativamente con una diferencia significativa ($p < 0,01$).

30

35

Tabla 3. Efecto de la Composición 4 sobre los niveles de AMPc y GMPc en suero y de los mastocitos de la mucosa nasal en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	AMPc (pmol/ml)	GMPc (pmol/ml)	Recuento de mastocitos (células)
Grupo de control en blanco	-	10	20,05 ± 4,97	9,80 ± 2,66	1,70 ± 1,39
Grupo de control modelo	-	10	10,30 ± 3,88**	14,85 ± 4,86**	14,29 ± 4,73**
Grupo de Bi-yan-kang	0,41	10	18,30 ± 3,59 ^{ΔΔ}	9,00 ± 2,46 ^{ΔΔ}	5,86 ± 2,19 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	14,15 ± 3,90 ^Δ	12,45 ± 3,95	8,91 ± 3,47 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis media de	2,0	10	15,85 ±	10,60 ±	7,77 ± 3,21 ^{ΔΔ}

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	AMPc (pmol/ml)	GMPc (pmol/ml)	Recuento de mastocitos (células)
fármaco de ensayo			5,24 ^Δ	2,82 ^Δ	
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	16,75 ± 4,09 ^{ΔΔ}	9,20 ± 3,96 ^{ΔΔ}	6,54 ± 2,06 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2 Efecto de la Composición 4 sobre la rinitis alérgica en cobayas causada por TDI

3.2.1 Efecto sobre el comportamiento de las cobayas

5 Los resultados se muestran en la Tabla 4. Tras la modelización, se puntuaron los signos de las cobayas de cada grupo modelizado sin que hubiera una diferencia significativa entre los mismos, lo que indicó una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, todas las puntuaciones de los signos de los grupos de dosis medias y altas del fármaco de ensayo y del grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$) y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

Tabla 4. Efecto de la Composición 4 sobre las puntuaciones de los síntomas de la rinitis alérgica en cobayas antes y después de la dosificación ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación		
				Día 7	Día 14	Día 21
Grupo de control en blanco	10	-	0,55 ± 0,71	0,49 ± 0,32	0,37 ± 0,29	0,43 ± 0,64
Grupo de control modelo	10	-	6,28 ± 1,22**	6,47 ± 1,17**	6,54 ± 1,02**	6,00 ± 0,96**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	6,63 ± 1,09**	5,34 ± 0,86 ^Δ	5,34 ± 0,92 ^Δ	4,77 ± 1,28 ^Δ
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	6,54 ± 1,30**	5,30 ± 1,35	5,69 ± 0,98	5,03 ± 1,32
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	6,42 ± 1,07**	5,03 ± 1,28 ^Δ	4,76 ± 1,32 ^{ΔΔ}	4,50 ± 0,77 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	6,69 ± 1,13**	4,56 ± 1,07 ^{ΔΔ}	3,93 ± 0,84 ^{ΔΔ}	3,67 ± 0,93 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

15 3.2.2 Efecto de la histamina en sangre y de la IgE en suero total en cobayas

20 Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5. En comparación con el grupo de control en blanco, aumentaron tanto la histamina en sangre como la IgE en suero total en el grupo modelo ($p < 0,01$), indicando una modelización experimental exitosa. En comparación con el grupo modelo, la absorbancia de la fluorescencia de la histamina y la concentración total de IgE en suero en los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo y en el grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), donde la histamina en los grupos de dosis media y alta disminuyó casi hasta el nivel normal, lo que indica que la Composición 4 fue eficaz en el tratamiento de la rinitis alérgica mediante la inhibición del nivel de histamina en sangre y de IgE en suero.

Tabla 5. Efecto de la Composición 4 sobre la histamina en sangre y de la IgE en suero total en cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Fluorescencia de la histamina (mg/l)	IgE (UI·ml ⁻¹)
Grupo de control en blanco	10	-	2,09 ± 0,40	0,123 ± 0,022
Grupo de control modelo	10	-	3,15 ± 0,90**	0,162 ± 0,034**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	2,13 ± 0,47 ^{ΔΔ}	0,122 ± 0,024 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	3,00 ± 0,45	0,136 ± 0,028
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	2,32 ± 0,42 ^Δ	0,128 ± 0,025 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	2,12 ± 0,38 ^{ΔΔ}	0,120 ± 0,010 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.3 Efecto sobre los eosinófilos (EOS) en la secreción nasal de cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. El número de eosinófilos en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el número de eosinófilos en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con el fármaco disminuyó significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$).

3.2.4 Efecto sobre el espesor de la mucosa nasal en cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. Como resultado, en comparación con el grupo de control en blanco, en el grupo modelo, se separó en diversos grados el epitelio de la mucosa sobre el tabique nasal de las cobayas, teniendo un espesor no uniforme y una estructura basal poco clara; las vénulas y los capilares de la lámina propia mostraron una aparente dilatación, el espacio tisular se expandió, y el espesor de la mucosa aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, los cambios patológicos anteriores en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con fármaco se aliviaron, y el espesor de la mucosa disminuyó significativamente ($p < 0,01$).

Tabla 6. Efecto de la Composición 4 sobre los EOS en la secreción nasal y en el espesor de la mucosa nasal en cobayas ($\bar{X} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Número de EOS ($\times 10^9/l$)	Espesor de la mucosa (mm)
Grupo de control en blanco	-	10	2,67 \pm 1,37	0,158 \pm 0,051
Grupo de control modelo	-	10	18,67 \pm 4,18**	0,285 \pm 0,072**
Grupo de Bi-yan-kang	0,41	10	9,29 \pm 3,8 $\Delta\Delta$	0,198 \pm 0,049 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	13,28 \pm 4,11 $\Delta\Delta$	0,215 \pm 0,048 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	11,42 \pm 3,56 $\Delta\Delta$	0,196 \pm 0,069 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	10,14 \pm 2,86 $\Delta\Delta$	0,187 \pm 0,061 $\Delta\Delta$

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$ frente al grupo modelo.

4. Conclusiones

Los estudios experimentales con animales demuestran que la eficacia de la Composición 4 se refleja principalmente en los siguientes aspectos: 1) es capaz de disminuir significativamente la puntuación de los síntomas nasales de las ratas modelizadas, aumentando el nivel de AMPc en suero y reduciendo el nivel de GMPc en ratas con rinitis alérgica; 2) reduce el número de mastocitos en la mucosa nasal de las ratas y reduce su infiltración en las zonas inflamadas; 3) es capaz de disminuir la puntuación de los síntomas nasales de las cobayas modelizadas; 4) disminuye el número de EOS en la secreción nasal de las cobayas y reduce la infiltración de los EOS en las zonas inflamadas; 5) es capaz de disminuir significativamente la concentración de histamina en sangre en las cobayas y de reducir los mediadores inflamatorios; 6) alivia la inflamación de la mucosa nasal de las cobayas. De acuerdo con los resultados de los estudios experimentales, se considera que la Composición 4 es eficaz para resistir la rinitis alérgica.

Ejemplo 56. Informe de experimentos con animales de la Composición 4 obtenida en el Ejemplo 4 contra la prevención y el tratamiento del asma alérgico

1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

El fármaco de ensayo fue la Composición 4 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma* y *Cordyceps*) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 10,97 g de fármacos brutos totales.

1.2 Animales de laboratorio

Igual que en Ejemplo 53.

1.3 Reactivos primarios

Igual que en Ejemplo 53.

1.4 Instrumentos primarios

Igual que en Ejemplo 53.

5 **2. Métodos experimentales**

2.1 Efecto sobre el asma alérgico en ratas causado por la OVA

2.1.1 Agrupamiento de animales

10 Las ratas (la mitad de las cuales era machos y la otra mitad era hembras) se dividieron aleatoriamente en dos grupos, es decir, un grupo de control en blanco de 10 animales y un grupo de modelización de 70 animales. Tras una modelización exitosa, las ratas se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos: un grupo de control modelo, un grupo positivo de fármaco (grupo de dexametasona) y los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 4, con 10 animales en cada grupo.

2.1.2 Establecimiento de modelos animales de asma alérgico en ratas

20 Igual que en Ejemplo 53.

2.1.3 Pauta posológica

25 La ingesta diaria del material compuesto de la Composición de fármaco 4 de ensayo en polvo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (9,12 mg de polvo seco/ml, 18,23 mg de polvo seco/ml, 54,69 mg de polvo seco/ml) para llevar a cabo los experimentos. El volumen de administración intragástrica se calculó como 1,0 ml/100 g de peso corporal. el grupo de control modelo recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica al 0,9 % 30 min antes de la exposición; y el grupo de fármaco positivo recibió dexametasona a una dosis de 0,5 mg/kg 30 min antes de cada desafío^[2]. Los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 4 recibieron cada uno por vía intragástrica la dosis respectiva del fármaco de ensayo 30 min antes de cada exposición. Al mismo tiempo, el grupo de control en blanco recibió por inyección intraperitoneal, se expuso a la atomización con o recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica al 0,9 %. La administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 21 días consecutivos.

2.1.4 Registro del período latente del asma en ratas

40 Igual que en Ejemplo 53.

2.1.5 Mediciones de los niveles de IL-4 e IFN-γ

45 Igual que en Ejemplo 53.

2.1.6 Medición del contenido de EOS en los tejidos pulmonares

Igual que en Ejemplo 53.

50 2.2 Efecto sobre el asma alérgico en cobayas causado por un gas mixto de Ach e His

2.2.1. Igual que en 2.1.1.

2.2.2 Establecimiento de modelos animales de asma alérgico en cobayas

55 Igual que en Ejemplo 53.

2.2.3 Pauta posológica

Igual que en 2.1.3.

60 2.2.4 Registro del período latente del asma

Igual que en 2.1.4.1.

65 2.2.5 Medición de la IgE en suero y de BALF

Igual que en Ejemplo 53.

2.3 Método estadístico

5 Igual que en Ejemplo 53.

3 Resultados

3.1 Efecto de la Composición 4 sobre el asma alérgico en ratas causado por la OVA

10

3.1.1 Efecto sobre el período latente del asma inducido en ratas

15

Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se puntuaron los períodos latentes de asma inducido en ratas de cada grupo modelizado, sin una diferencia significativa entre ellos, lo que indica una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, los períodos latentes de asma inducido en las ratas del grupo de control positivo y los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo se prolongaron significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$).

Tabla 1. Efecto de la Composición 4 sobre el período latente del asma inducido en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación
Grupo de control en blanco	10	-	360	360
Grupo de control modelo	10	-	77,24 \pm 13,82**	75,54 \pm 12,86**
Grupo de control positivo	10	0,5 mg/kg	74,66 \pm 11,09**	159,77 \pm 20,28 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	75,63 \pm 15,30**	85,03 \pm 21,32
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	78,52 \pm 14,07**	96,50 \pm 23,65 Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	78,59 \pm 17,13**	102,67 \pm 23,87 $\Delta\Delta$

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$ frente al grupo modelo.

20

3.1.2 Efecto sobre los niveles de IL-4 e IFN- γ en ratas

25

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 2. En comparación con el grupo de control en blanco, el grupo modelo mostró una significativa disminución del nivel de IFN- γ en suero ($p < 0,01$), pero un nivel significativamente aumentado de IL-4 en suero ($p < 0,01$), lo que indica un gran desequilibrio de la proporción de IFN- γ /IL-4 durante los ataques de asma. En comparación con el grupo modelo, el grupo de dexametasona y los grupos de dosis media y alta del fármaco de ensayo mostraron un nivel de IL-4 significativamente reducido ($p < 0,05$ o $p < 0,01$) y un nivel de IFN- γ significativamente mayor ($p < 0,05$ o $p < 0,01$), lo que indica que el fármaco de ensayo puede corregir la proporción desequilibrada de IFN- γ /IL-4.

30

Tabla 2. Efecto de la Composición 4 sobre los niveles de IL-4 e IFN- γ en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	IL-4 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
Grupo de control en blanco	-	10	12,72 \pm 2,53	24,31 \pm 4,17
Grupo de control modelo	-	10	22,45 \pm 3,58**	11,85 \pm 3,46**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	13,51 \pm 4,31 $\Delta\Delta$	20,26 \pm 4,86 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	20,57 \pm 3,18	13,78 \pm 3,77
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	18,25 \pm 4,14 Δ	15,60 \pm 3,82 Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	16,12 \pm 3,37 $\Delta\Delta$	17,36 \pm 4,96 $\Delta\Delta$

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.1.3 Efecto sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de rata

35

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. El número de EOS en ratas en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el grupo de control positivo y los grupos de dosis media y alta de fármaco de ensayo mostraron un número significativamente reducido de EOS ($p < 0,01$), lo que

indica que la Composición 4 es eficaz en el tratamiento del asma alérgico, posiblemente al reducir el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de las ratas.

Tabla 3. Efecto de la Composición 4 sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de rata ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	EOS (células/HP)
Grupo de control en blanco	-	10	2,24 ± 0,85
Grupo de control modelo	-	10	103,60 ± 13,94**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	28,39 ± 4,26 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	93. 21 ± 11,29
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	78,13 ± 10,34 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	65,22 ± 8,49 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

5

3.2 Efecto de la Composición 4 sobre el asma alérgico en cobayas causado por un gas mixto de Ach e His

3.2.1 Efecto sobre el período latente del asma inducido en cobayas

- 10 Los resultados se muestran en la Tabla 4. Tras la modelización, se puntuaron los períodos latentes de asma inducido en cobayas de cada grupo modelizado, sin una diferencia significativa entre ellos, lo que indica una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, los períodos latentes de asma inducido en las cobayas del grupo de control positivo y los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo se prolongaron significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$), lo que indica que la Composición 4
- 15 aumenta enormemente los síntomas asmáticos en las cobayas.

Tabla 4. Efecto de la Composición 4 sobre el período latente del asma inducido en cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación
Grupo de control en blanco	10	-	360	360
Grupo de control modelo	10	-	76,18 ± 10,82**	77,00 ± 10,96**
Grupo de control positivo	10	0,5 mg/kg	75,63 ± 9,09**	155,77 ± 16,28 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	76,54 ± 14,30**	83,03 ± 21,32
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	77,82 ± 15,07**	97,50 ± 24,77 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	79,69 ± 19,13**	110,67 ± 24,93 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

20

3.2.2 Efecto sobre la IgE total en suero y sobre BALF de cobayas

- Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5. El contenido total de IgE en suero y de BALF en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el contenido total de IgE en suero y de BALF en el grupo de dexametasona y en los grupos en dosis media y alta del fármaco de ensayo disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), lo que indica que tanto la dexametasona como el fármaco de
- 25 ensayo pueden inhibir la respuesta inflamatoria alérgica en el pulmón de cobaya y mejorar los síntomas asmáticos.

Tabla 5. Efecto de la Composición 4 sobre la IgE total en suero y sobre BALF de cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Suero (U/l)	BALF (U/l)
Grupo de control en blanco	-	10	2,04 ± 0,83	3,61 ± 0,84
Grupo de control modelo	-	10	5,62 ± 1,37**	5,32 ± 1,24**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	3,75 ± 1,31 ^{ΔΔ}	3,72 ± 0,72 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	5,11 ± 2,18	4,15 ± 1,57

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Suero (U/l)	BALF (U/l)
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	4,25 ± 1,14 ^Δ	3,92 ± 1,45 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	4,01 ± 1,09 ^{ΔΔ}	3,89 ± 0,96 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.3 Efecto sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. En comparación con el grupo de control en blanco, el nivel de recuento de EOS en las cobayas del grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el nivel de recuento de EOS en el grupo de control positivo y los grupos de dosis media y alta de fármaco de ensayo se redujo significativamente ($p < 0,01$), lo que indica que la Composición 4 es eficaz en el tratamiento del asma alérgico, posiblemente al reducir el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de las cobayas.

Tabla 6. Efecto de la Composición 4 sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	EOS (células/HP)
Grupo de control en blanco	-	10	5,24 ± 2,85
Grupo de control modelo	-	10	93,60 ± 14,94 ^{**}
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	30,79 ± 7,25 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	82,28 ± 12,19
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	70,25 ± 12,04 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	59,22 ± 11,69 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

4. Conclusiones

Los estudios experimentales con animales demuestran que la Composición 4 es capaz de mejorar significativamente los síntomas asmáticos en ratas y de prolongar el período de latencia del asma inducido en cobayas en los grupos modelo; de reducir el nivel de IL-4 en suero, de aumentar el nivel de IFN- γ en suero y corregir la proporción desequilibrada de IFN- γ /IL-4 en ratas con asma; de reducir el número de EOS en los tejidos pulmonares de las ratas y cobayas, y mejorar la infiltración de los EOS en las zonas inflamadas; de reducir el contenido total de IgE en suero y de BALF de las cobayas, y mejorar los síntomas inflamatorios pulmonares. Por lo tanto, la Composición 4 se considera eficaz en la resistencia al asma alérgico.

Ejemplo 57. Informe de experimentos con animales de la Composición 5 obtenida en el Ejemplo 5 contra la alergia y la dermatitis alérgica

1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

El fármaco de ensayo fue la Composición 5 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y *Cordyceps*) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 12,39 g de fármacos brutos totales. Su ingesta diaria recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal.

1.2 Animales de laboratorio

Igual que en Ejemplo 51.

1.3 Reactivos primarios

Igual que en Ejemplo 51.

1.4 Instrumentos primarios

Igual que en Ejemplo 51.

5 **2. Métodos experimentales**

2.1 Agrupamiento de animales

10 Se dividieron los animales aleatoriamente en grupos con 10 animales por grupo en función del peso corporal. Un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 5, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona).

2.2 Pauta posológica

15 La ingesta diaria de la Composición de fármaco 5 de ensayo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para un ratón fue: grupo de dosis baja: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 4,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 12,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 5, 10 y 30 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (16,14 mg de polvo seco/ml, 32,28 mg de polvo seco/ml y 96,84 mg de polvo seco/ml) con agua destilada para llevar a cabo los experimentos.

25 La ingesta diaria para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (8,08 mg de polvo seco/ml, 16,14 mg de polvo seco/ml y 48,42 mg de polvo seco/ml) con agua destilada para llevar a cabo los experimentos.

30 2.3 Efecto de la Composición 5 sobre la anafilaxia pasiva (PCA) en ratas causada por la ovoalbúmina

2.3.1 Preparación de antisuero

Igual que en Ejemplo 51.

35 2.3.2 Establecimiento de modelos de suero anti-ovoalbúmina de rata^[1]

40 Se tomó suero anti-ovoalbúmina y se diluyó a 1:4 o 1:8 con solución salina fisiológica. Se dividieron aleatoriamente 50 ratas en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 5, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratas por grupo. El grupo de control modelo recibió agua destilada por vía intragástrica; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 5 recibieron las soluciones de ensayo por vía intragástrica a diferentes concentraciones en un volumen de dosificación de 10 ml/kg; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 14 días consecutivos. El día 15, se afeitó el lomo de las ratas, y se inyectó por vía intradérmica un antisuero diluido en dos puntos de cada lado con 0,1 ml por punto.

45 Tras 48 horas, se inyectó en la vena de la cola de cada rata una solución mixta de 1,0 ml de azul de Evans al 1 % y de ovoalbúmina al 1 % en solución salina fisiológica. Tras 30 min, se extrajo sangre arterial, se aisló el suero de la misma y se determinó el contenido de histamina mediante el método^[2]. Se sacrificaron las ratas y se invirtió la piel del lomo para medir el diámetro de las manchas de reacción azules con el fin de determinar la diferencia entre los grupos de dosificación y el grupo modelo. Se fijó una muestra del tejido cutáneo de rata con formaldehído neutro, se deshidrató con un gradiente de alcohol, se embebió en parafina y se examinó para determinar la desgranulación de los mastocitos en el tejido^[3].

55 2.3.3 Efecto de la Composición 5 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno^[4]

60 Se dividieron aleatoriamente los ratones en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 5, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratones por grupo. Se aplicó una solución al 5 % de 2,4-dinitroclorobenceno en etanol sobre la piel abdominal (afeitada) de los ratones para la sensibilización. Se llevó a cabo la administración intragástrica dos días antes de la sensibilización; el grupo de control modelo recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de agua destilada; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 5 recibieron las soluciones de ensayo correspondientes por vía intragástrica a un volumen de dosis de 0,1 ml/10 g de peso corporal; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 10 días consecutivos. 7 días después de la sensibilización, se aplicó una solución al 1 % de 2,4-dinitroclorobenceno en la oreja derecha, y se sacrificaron los ratones tras 24 horas, y se cortaron ambas orejas a lo largo de la línea de base de la aurícula. Se perforaron discos que tenían un diámetro de 8 mm en la misma posición en ambas orejas, se pesaron con precisión en una balanza electrónica, y se tomó la diferencia de peso entre la oreja izquierda y derecha

como el valor de hipersensibilidad retardada.

2.3.4 Efecto de la Composición 5 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular^[5]

5 Se dividieron aleatoriamente los ratones en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 5, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratones por grupo. Se llevó a cabo la administración intragástrica a los ratones una vez al día durante 10 días consecutivos. 30 min después de la administración final, se inyectó una solución de dextrano de bajo peso molecular al 0,0125 % a 0,1 g/10 g en la vena de la cola. Se observó y registró el número de eventos de picazón (los eventos de picazón se indicaron al rascarse la cabeza con las patas delanteras, al rascarse el cuerpo con las patas traseras y al morder en varias partes del cuerpo) ocurrido en el transcurso de los 30 min posteriores a la inyección de la solución de dextrano de bajo peso molecular en las venas de la cola de los ratones de cada grupo.

2.3.5 Efecto de la Composición 5 sobre la permeabilidad capilar en ratas^[6]

15 Se dividieron aleatoriamente las ratas en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 5, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratas por grupo. El grupo de control modelo recibió agua destilada por vía intragástrica; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 5 recibieron las soluciones de ensayo por vía intragástrica a diferentes concentraciones en un volumen de dosificación de 10 ml/kg; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 10 días consecutivos. 1 hora después de la administración final, se inyectó en la zona afeitada (afeitada antes de la administración) del lomo de las ratas por vía intradérmica 1 mg/ml de fosfato de histamina a una dosis de 0,1 ml/rata, y luego se inyectó en la vena de la cola de inmediato una solución acuosa de azul de Evans al 1 % a una dosis de 1 ml/rata. Tras 20 minutos, se sacrificaron los animales por dislocación cervical. Se retiraron cortando las zonas de la piel con manchas azules y se cortaron en trozos pequeños, se empaparon en una solución de 5 ml de acetona:solución salina fisiológica (7:3) durante 48 horas, se centrifugaron, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 610 nm.

2.4 Método estadístico

30 Los datos experimentales se presentaron en $\bar{X} \pm S$. Se empleó un análisis ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre el grupo de control modelo y los grupos en varias dosis de la Composición 5. $p < 0,05$ se consideró como significativamente diferente. $p < 0,01$ se consideró como muy significativamente diferente.

35 3. Resultados

3.1 Efecto de la Composición 5 sobre la anafilaxia pasiva en ratas

40 Los resultados del ensayo se muestran en las Tablas 1 y 2. En comparación con el grupo de control modelo, el grupo de dosis baja de la Composición 5 mostró una tendencia a disminuir el diámetro de las manchas azules en ratas con sensibilidad al suero anti-ovoalbúmina a 1:4 y 1:8, a disminuir la desgranulación de los mastocitos y a disminuir el contenido de histamina en suero, que, sin embargo, no tuvo significación estadística; el grupo de control de prednisona y los grupos de dosis medias y altas de la Composición 5 mostraron un efecto de disminución significativa del diámetro de las manchas azules en ratas sensibilizadas con suero anti-ovoalbúmina a 1:4 y 1:8, reduciéndose la desgranulación de los mastocitos y reduciéndose el contenido de histamina en suero, con una diferencia estadística significativa o muy significativa. Esto indica que la Composición 5 tuvo un efecto inhibitorio significativo sobre la anafilaxia pasiva en ratas.

Tabla 1. Efecto de la Composición 5 sobre el diámetro de las manchas azules de PCA en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Diámetro de manchas azules (mm)	
			1:4	1:8
Grupo de control modelo	0,0	10	15,66 ± 2,28	9,54 ± 1,52
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	11,35 ± 1,74**	6,72 ± 1,31**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	13,92 ± 1,95	8,53 ± 1,28
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	12,77 ± 2,24*	8,07 ± 1,30*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	12,10 ± 2,30**	7,32 ± 1,17**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

50

Tabla 2. Efecto de la Composición 5 sobre la desgranulación de los mastocitos y el contenido de histamina en suero en ratas PCA ($\bar{X} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Desgranulación	Fluorescencia de la histamina (mg/l)
Grupo de control modelo	0,0	10	59,42 \pm 12,16	3,95 \pm 0,87
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	21,33 \pm 10,48**	2,12 \pm 0,72**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	48,05 \pm 12,54	3,21 \pm 0,80
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	44,29 \pm 12,66*	2,85 \pm 0,84*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	34,80 \pm 12,07**	2,43 \pm 0,62**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

5 3.2 Efecto de la Composición 5 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno

Los resultados se muestran en la Tabla 3. En comparación con el grupo de control modelo, el grado de inflamación de los discos auriculares de los ratones disminuyó significativamente en los grupos de la dosis media y alta de Composición 5, lo que indica que la Composición 5 tuvo un buen efecto inhibitor sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por 2,4-dinitroclorobenceno.

Tabla 3. Efecto de la Composición 5 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno ($\bar{X} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Grado de inflamación de los discos auriculares de ratón (mg)
Grupo de control modelo	0,0	10	6,82 \pm 0,86
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	4,80 \pm 0,73**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	2,0	10	6,21 \pm 0,69
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	4,0	10	5,86 \pm 0,76*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	12,0	10	5,21 \pm 0,85**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

15 3.3 Efecto de la Composición 5 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular

Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 4. En comparación con el grupo de control modelo, el valor de DO disminuyó significativamente en los grupos de ratas de dosis media y alta de Composición 5, lo que indica que la Composición 5 fue significativamente eficaz en disminuir el aumento de la permeabilidad capilar en ratas causado por el fosfato de histamina.

Tabla 4. Efecto de la Composición 5 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular ($\bar{X} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Número de eventos de picazón (30 min)
Grupo de control modelo	0,0	10	28,66 \pm 6,70
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	17,20 \pm 4,08**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	2,0	10	23,21 \pm 5,90
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	4,0	10	20,42 \pm 6,34*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	12,0	10	18,55 \pm 4,92**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

3.4 Efecto de la Composición 5 sobre la permeabilidad capilar en ratas

Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 5. En comparación con el grupo de control modelo, el valor de DO disminuyó significativamente en los grupos de ratas de dosis media y alta de Composición 5, lo que indica que la Composición 5 fue significativamente eficaz en disminuir el aumento de la permeabilidad capilar en ratas causado por el fosfato de histamina.

Tabla 5. Efecto de la Composición 5 sobre la permeabilidad capilar en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Valor de DO
Grupo de control modelo	0,0	10	1,020 \pm 0,130
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	0,756 \pm 0,102**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	0,953 \pm 0,133
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	0,908 \pm 0,105*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	0,842 \pm 0,094**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

4. Conclusiones

Los estudios experimentales en animales demuestran que la Composición 5 es significativamente eficaz en la inhibición de la anafilaxia pasiva en ratas causada por la ovoalbúmina, que la Composición 5 es eficaz en la inhibición de la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno y que la Composición 5 es significativamente eficaz en reducir el aumento de la permeabilidad capilar en las ratas causado por el fosfato de histamina. Los resultados anteriores indican una buena eficacia de la Composición 5 para resistir las alergias, y para prevenir y tratar enfermedades alérgicas tales como la dermatitis alérgica y la urticaria.

Ejemplo 58. Informe de experimentos con animales de la Composición 5 obtenida en el Ejemplo 5 contra la prevención y el tratamiento de la rinitis alérgica

1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

El fármaco de ensayo fue la Composición 5 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y *Cordyceps*) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 12,39 g de fármacos brutos totales.

1.2 Animales de laboratorio

Igual que en Ejemplo 52.

1.3 Reactivos primarios

Igual que en Ejemplo 52.

1.4 Instrumentos primarios

Igual que en Ejemplo 52.

2. Métodos experimentales

2.1 Efecto sobre la rinitis alérgica en ratas causada por la OVA

2.1.1 Agrupamiento de animales

Se dividieron aleatoriamente ratas en dos grupos, es decir, un grupo de control en blanco de 10 animales y un grupo de modelización de 70 animales. Tras una modelización exitosa, las ratas se dividieron aleatoriamente, en función de su puntuación, en los siguientes grupos: un grupo de control modelo, un grupo de positivo de fármaco (grupo de Bi-yan-kang) y los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 5, con 10 animales en cada grupo.

2.1.2 Pauta posológica

La ingesta diaria del material compuesto de la Composición de fármaco 5 de ensayo en polvo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. El grupo de control en blanco y el grupo modelo de rinitis alérgica recibieron por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica; el grupo de Bi-yan-kang recibió el fármaco a una dosis de 410 mg/kg. El volumen de administración intragástrica se calculó como 1,0 ml/100 g de peso corporal. La administración intragástrica se inició después de una modelización exitosa y se llevó a cabo una vez al día durante 21 días consecutivos.

2.1.3 Establecimiento de modelos animales de rinitis alérgica en ratas

Igual que en Ejemplo 52.

2.1.4 Indicadores de ensayo

Igual que en Ejemplo 52.

2.1.4.1 Medición del AMPc y GMPc en sangre

Igual que en Ejemplo 52.

2.1.4.2 Recuento de mastocitos de la mucosa nasal

Igual que en Ejemplo 52.

2.2 Efecto sobre la rinitis alérgica en cobayas causada por TDI

2.2.1. Igual que en 2.1.1.

2.2.2. Igual que en 2.1.2.

2.2.3 Establecimiento de modelos animales de rinitis alérgica en cobaya

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4 Indicadores de ensayo

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.1 Observación del comportamiento de las cobayas

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.2 Recuento de eosinófilos (EOS) en la secreción nasal

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.3 Medición de IgE en suero total e histamina en sangre

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.4 Medición del espesor de la mucosa nasal

Igual que en Ejemplo 52.

2.3 Método estadístico

Los datos experimentales se presentaron en $\bar{X} \pm S$. Se empleó un análisis ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre el grupo de control en blanco, el grupo de control modelo y los grupos en varias dosis de la Composición 5. $p < 0,05$ se consideró como significativamente diferente. $p < 0,01$ se consideró como muy significativamente diferente.

3. Resultados

3.1 Efecto de la Composición 5 sobre la rinitis alérgica en ratas causada por la ovoalbúmina

3.1.1 Efecto sobre el comportamiento de las ratas

5 Los resultados se muestran en la Tabla 2. Tras la modelización, se puntuaron los signos de las ratas de cada grupo modelizado sin que hubiera una diferencia significativa entre los mismos, lo que indicó una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, todas las puntuaciones de los signos de los grupos de dosis medias y altas del fármaco de ensayo y del grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$) y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

10 Tabla 2. Efecto de la Composición 5 sobre las puntuaciones de los síntomas de la rinitis alérgica en ratas antes y después de la dosificación ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación		
				Día 7	Día 14	Día 21
Grupo de control en blanco	10	-	0,33 ± 0,29	0,44 ± 0,26	0,39 ± 0,21	0,35 ± 0,19
Grupo de control modelo	10	-	6,71 ± 1,49**	6,57 ± 1,24**	7,10 ± 1,35**	6,51 ± 1,18**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	6,58 ± 1,21**	3,21 ± 0,97 ^{ΔΔ}	3,68 ± 1,23 ^{ΔΔ}	2,95 ± 1,02 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	6,75 ± 1,18**	5,82 ± 0,87	5,89 ± 1,42	5,63 ± 1,08
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	6,54 ± 1,29**	5,40 ± 1,24 ^Δ	5,31 ± 1,45 ^Δ	4,57 ± 1,43 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	6,75 ± 1,14**	4,68 ± 0,84 ^{ΔΔ}	4,45 ± 1,38 ^{ΔΔ}	4,26 ± 1,31 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo de control en blanco; $p < 0,05$, $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.1.2 Efecto de la Composición 5 sobre los niveles de AMPc y GMPc en suero en ratas

15 Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. En comparación con el grupo de control en blanco, el grupo modelo mostró una significativa disminución del nivel de AMPc en suero ($p < 0,01$) y un nivel significativamente aumentado de GMPc en suero ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, el grupo de Bi-yan-kang y todos los grupos de fármaco de ensayo mostraron un nivel de AMPc en suero significativamente aumentado ($p < 0,01$ o $p < 0,05$); el grupo de Bi-yan-kang y los grupos de dosis media y alta del fármaco de ensayo mostraron un nivel de GMPc en suero significativamente reducido ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

3.1.3 Efecto de la Composición 5 sobre los mastocitos en la mucosa nasal de rata

25 Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. El número de mastocitos de la mucosa nasal en el grupo de control modelo aumentó significativamente con una diferencia altamente significativa ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, el número de mastocitos de la mucosa nasal en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con el fármaco de ensayo disminuyó significativamente con una diferencia significativa ($p < 0,01$).

30 Tabla 3. Efecto de la Composición 5 sobre los niveles de AMPc y GMPc en suero y de los mastocitos de la mucosa nasal en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	AMPc (pmol/ml)	GMPc (pmol/ml)	Recuento de mastocitos (células)
Grupo de control en blanco	-	10	19,98 ± 4,96	9,72 ± 2,64	1,69 ± 1,41
Grupo de control modelo	-	10	10,27 ± 3,85**	14,83 ± 4,88**	14,33 ± 4,75**
Grupo de Bi-yan-kang	0,41	10	18,25 ± 3,62 ^{ΔΔ}	9,03 ± 2,52 ^{ΔΔ}	5,87 ± 2,23 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	14,13 ± 3,91 ^Δ	12,40 ± 4,01	8,64 ± 3,51 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	15,86 ± 5,23 ^Δ	10,58 ± 2,84 ^Δ	7,79 ± 3,18 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	17,74 ± 4,12 ^{ΔΔ}	9,25 ± 4,05 ^{ΔΔ}	6,56 ± 2,17 ^{ΔΔ}

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	AMPc (pmol/ml)	GMPc (pmol/ml)	Recuento de mastocitos (células)
--------	-------------------------------	--------------------	----------------	----------------	----------------------------------

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; $p < 0,05$, $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2 Efecto de la Composición 5 sobre la rinitis alérgica en cobayas causada por TDI

3.2.1 Efecto sobre el comportamiento de las cobayas

5 Los resultados se muestran en la Tabla 4. Tras la modelización, se puntuaron los signos de las cobayas de cada grupo modelizado sin que hubiera una diferencia significativa entre los mismos, lo que indicó una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, todas las puntuaciones de los signos de los grupos de dosis medias y altas del fármaco de ensayo y del grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$) y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

Tabla 4. Efecto de la Composición 5 sobre las puntuaciones de los síntomas de la rinitis alérgica en cobayas antes y después de la dosificación ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación		
				Día 7	Día 14	Día 21
Grupo de control en blanco	10	-	0,57 \pm 0,73	0,48 \pm 0,35	0,36 \pm 0,30	0,41 \pm 0,66
Grupo de control modelo	10	-	6,27 \pm 1,24**	6,51 \pm 1,18**	6,51 \pm 1,04**	5,91 \pm 0,92**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	6,65 \pm 1,13**	5,31 \pm 0,87 ^Δ	5,364 \pm 0,91 ^Δ	4,79 \pm 1,31 ^Δ
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	6,56 \pm 1,28**	5,37 \pm 1,35	5,72 \pm 0,99	5,08 \pm 1,35
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	6,44 \pm 1,05**	5,35 \pm 1,26 ^Δ	4,75 \pm 1,30 ^{ΔΔ}	4,54 \pm 0,79 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	6,71 \pm 1,15**	4,57 \pm 1,08 ^{ΔΔ}	3,94 \pm 0,87 ^{ΔΔ}	3,66 \pm 0,95 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

15 3.2.2 Efecto de la histamina en sangre y de la IgE en suero total en cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5. En comparación con el grupo de control en blanco, aumentaron tanto la histamina en sangre como la IgE en suero total en el grupo modelo ($p < 0,01$), indicando una modelización experimental exitosa. En comparación con el grupo modelo, la absorbancia de la fluorescencia de la histamina y la concentración total de IgE en suero en los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo y en el grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), donde la histamina en los grupos de dosis media y alta disminuyó casi hasta el nivel normal, lo que indica que la Composición 5 fue eficaz en el tratamiento de la rinitis alérgica mediante la inhibición del nivel de histamina en sangre y de IgE en suero.

25 Tabla 5. Efecto de la Composición 5 sobre la histamina en sangre y de la IgE en suero total en cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Fluorescencia de la histamina (mg/l)	IgE (UI·ml ⁻¹)
Grupo de control en blanco	10	-	2,13 \pm 0,34	0,125 \pm 0,021
Grupo de control modelo	10	-	3,17 \pm 0,88**	0,160 \pm 0,033**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	2,15 \pm 0,46 ^{ΔΔ}	0,121 \pm 0,025 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	2,94 \pm 0,46	0,135 \pm 0,029
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	2,33 \pm 0,41 ^Δ	0,124 \pm 0,026 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	2,15 \pm 0,37 ^{ΔΔ}	0,118 \pm 0,009 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.3 Efecto sobre los eosinófilos (EOS) en la secreción nasal de cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. El número de eosinófilos en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el número de eosinófilos en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con el fármaco disminuyó significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$).

3.2.4 Efecto sobre el espesor de la mucosa nasal en cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. Como resultado, en comparación con el grupo de control en blanco, en el grupo modelo, se separó en diversos grados el epitelio de la mucosa sobre el tabique nasal de las cobayas, teniendo un espesor no uniforme y una estructura basal poco clara; las vénulas y los capilares de la lámina propia mostraron una aparente dilatación, el espacio tisular se expandió, y el espesor de la mucosa aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, los cambios patológicos anteriores en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con fármaco se aliviaron, y el espesor de la mucosa disminuyó significativamente ($p < 0,01$).

Tabla 6. Efecto de la Composición 5 sobre los EOS en la secreción nasal y en el espesor de la mucosa nasal en cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Número de EOS ($\times 10^{-1}/l$)	Espesor de la mucosa (mm)
Grupo de control en blanco	-	10	2,68 \pm 1,36	0,157 \pm 0,050
Grupo de control modelo	-	10	18,64 \pm 4,14**	0,283 \pm 0,071**
Grupo de Bi-yan-kang	0,41	10	9,27 \pm 3,75 $\Delta\Delta$	0,199 \pm 0,047 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	11,27 \pm 4,13 $\Delta\Delta$	0,214 \pm 0,049 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	9,44 \pm 3,55 $\Delta\Delta$	0,191 \pm 0,067 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	7,12 \pm 2,76 $\Delta\Delta$	0,186 \pm 0,059 $\Delta\Delta$

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$ frente al grupo modelo.

20 4. Conclusiones

Los estudios experimentales con animales demuestran que la eficacia de la Composición 5 se refleja principalmente en los siguientes aspectos: 1) es capaz de disminuir significativamente la puntuación de los síntomas nasales de las ratas modelizadas, aumentando el nivel de AMPc en suero y reduciendo el nivel de GMPc en ratas con rinitis alérgica; 2) reduce el número de mastocitos en la mucosa nasal de las ratas y reduce su infiltración en las zonas inflamadas; 3) es capaz de disminuir la puntuación de los síntomas nasales de las cobayas modelizadas; 4) disminuye el número de EOS en la secreción nasal de las cobayas y reduce la infiltración de los EOS en las zonas inflamadas; 5) es capaz de disminuir significativamente la concentración de histamina en sangre en las cobayas y de reducir los mediadores inflamatorios; 6) alivia la inflamación de la mucosa nasal de las cobayas. De acuerdo con los resultados de los estudios experimentales, se considera que la Composición 5 es eficaz para resistir la rinitis alérgica.

35 Ejemplo 59. Informe de experimentos con animales de la Composición 5 obtenida en el Ejemplo 5 contra la prevención y el tratamiento del asma alérgico

35 1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

40 El fármaco de ensayo fue la Composición 5 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y *Cordyceps*) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 12,39 g de fármacos brutos totales.

45 1.2 Animales de laboratorio

Igual que en Ejemplo 53.

1.3 Reactivos primarios

50 Igual que en Ejemplo 53.

1.4 Instrumentos primarios

Igual que en Ejemplo 53.

5 **2. Métodos experimentales**

2.1 Efecto sobre el asma alérgico en ratas causado por la OVA

2.1.1 Agrupamiento de animales

10 Las ratas (la mitad de las cuales era machos y la otra mitad era hembras) se dividieron aleatoriamente en dos grupos, es decir, un grupo de control en blanco de 10 animales y un grupo de modelización de 70 animales. Tras una modelización exitosa, las ratas se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos: un grupo de control modelo, un grupo positivo de fármaco (grupo de dexametasona) y los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 5, con 10 animales en cada grupo.

2.1.2 Establecimiento de modelos animales de asma alérgico en ratas

20 Igual que en Ejemplo 53.

2.1.3 Pauta posológica

25 La ingesta diaria del material compuesto de la Composición de fármaco 5 de ensayo en polvo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (8,07 mg de polvo seco/ml, 16,14 mg de polvo seco/ml, 48,43 mg de polvo seco/ml) para llevar a cabo los experimentos. El volumen de administración intragástrica se calculó como 1,0 ml/100 g de peso corporal. el grupo de control modelo recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica al 0,9 % 30 min antes de la exposición; y el grupo de fármaco positivo recibió dexametasona a una dosis de 0,5 mg/kg 30 min antes de cada desafío^[2]. Los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 5 recibieron cada uno por vía intragástrica la dosis respectiva del fármaco de ensayo 30 min antes de cada exposición. Al mismo tiempo, el grupo de control en blanco recibió por inyección intraperitoneal, se expuso a la atomización con o recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica al 0,9 %. La administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 21 días consecutivos.

2.1.4 Registro del período latente del asma en ratas

40 Igual que en Ejemplo 53.

2.1.5 Mediciones de los niveles de IL-4 e IFN-γ

45 Igual que en Ejemplo 53.

2.1.6 Medición del contenido de EOS en los tejidos pulmonares

Igual que en Ejemplo 53.

50 2.2 Efecto sobre el asma alérgico en cobayas causado por un gas mixto de Ach e His

2.2.1. Igual que en 2.1.1.

2.2.2 Establecimiento de modelos animales de asma alérgico en cobayas

55 Igual que en Ejemplo 53.

2.2.3 Pauta posológica

Igual que en 2.1.3.

60 2.2.4 Registro del período latente del asma

Igual que en 2.1.4.1.

65 2.2.5 Medición de la IgE en suero y de BALF

Se empleó radioinmunoensayo de tipo sándwich de doble anticuerpo.

2.3 Método estadístico

5 Igual que en Ejemplo 53.

3. Resultados

3.1 Efecto de la Composición 5 sobre el asma alérgico en ratas causado por la OVA

10

3.1.1 Efecto sobre el período latente del asma inducido en ratas

15

Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se puntuaron los períodos latentes de asma inducido en ratas de cada grupo modelizado, sin una diferencia significativa entre ellos, lo que indica una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, los períodos latentes de asma inducido en las ratas del grupo de control positivo y los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo se prolongaron significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$).

Tabla 1. Efecto de la Composición 5 sobre el período latente del asma inducido en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación
Grupo de control en blanco	10	-	360	360
Grupo de control modelo	10	-	77,31 \pm 13,84**	75,61 \pm 12,89**
Grupo de control positivo	10	0,5 mg/kg	74,64 \pm 11,03**	160,21 \pm 20,32 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	75,62 \pm 15,28**	85,04 \pm 21,35
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	78,49 \pm 14,08**	96,48 \pm 23,61 Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	77,84 \pm 17,43**	102,68 \pm 23,85 $\Delta\Delta$

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$ frente al grupo modelo.

20

3.1.2 Efecto sobre los niveles de IL-4 e IFN- γ en ratas

25

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 2. En comparación con el grupo de control en blanco, el grupo modelo mostró una significativa disminución del nivel en suero de IFN- γ ($p < 0,01$), pero un aumento significativo del nivel de IL-4 en suero ($p < 0,01$), lo que indica un grave desequilibrio de la proporción de IFN- γ /IL-4 durante los ataques de asma. En comparación con el grupo modelo, el grupo de dexametasona y los grupos de dosis media y alta del fármaco de ensayo mostraron un nivel de IL-4 significativamente reducido ($p < 0,05$ o $p < 0,01$) y un nivel de IFN- γ significativamente mayor ($p < 0,05$ o $p < 0,01$), lo que indica que el fármaco de ensayo puede corregir la proporción desequilibrada de IFN- γ /IL-4.

30

Tabla 2. Efecto de la Composición 5 sobre los niveles de IL-4 e IFN- γ en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	IL-4 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
Grupo de control en blanco	-	10	12,70 \pm 2,55	24,29 \pm 4,18
Grupo de control modelo	-	10	22,46 \pm 3,57**	11,81 \pm 3,42**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	13,50 \pm 4,28 $\Delta\Delta$	20,27 \pm 4,88 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	20,59 \pm 3,15	13,79 \pm 3,71
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	18,26 \pm 4,13 Δ	15,58 \pm 3,80 Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	16,14 \pm 3,32 $\Delta\Delta$	17,32 \pm 4,98 $\Delta\Delta$

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.1.3 Efecto sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de rata

35

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. El número de EOS en ratas en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el grupo de control positivo y los grupos de dosis media y alta de fármaco de ensayo mostraron un número significativamente reducido de EOS ($p < 0,01$), lo que

indica que la Composición 5 es eficaz en el tratamiento del asma alérgico, posiblemente al reducir el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de las ratas.

Tabla 3. Efecto de la Composición 5 sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de rata ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	EOS (células/HP)
Grupo de control en blanco	-	10	2,26 ± 0,87
Grupo de control modelo	-	10	105,60 ± 13,96**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	28,42 ± 4,24 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	95,23 ± 11,32
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	71,43 ± 10,44 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	65,32 ± 8,59 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

5

3.2 Efecto de la Composición 5 sobre el asma alérgico en cobayas causado por un gas mixto de Ach e His

3.2.1 Efecto sobre el período latente del asma inducido en cobayas

10 Los resultados se muestran en la Tabla 4. Tras la modelización, se puntuaron los períodos latentes de asma inducido en cobayas de cada grupo modelizado, sin una diferencia significativa entre ellos, lo que indica una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, los períodos latentes de asma inducido en las cobayas del grupo de control positivo y los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo se prolongaron significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$), lo que indica que la Composición 5
15 aumenta enormemente los síntomas asmáticos en las cobayas.

Tabla 4. Efecto de la Composición 5 sobre el período latente del asma inducido en cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación
Grupo de control en blanco	10	-	360	360
Grupo de control modelo	10	-	77,18 ± 10,82**	78,03 ± 10,94**
Grupo de control positivo	10	0,5 mg/kg	75,65 ± 9,10**	155,78 ± 16,24 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	76,51 ± 14,32**	83,01 ± 21,35
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	77,83 ± 15,08**	97,49 ± 24,75 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	79,64 ± 19,14**	110,64 ± 24,91 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.2 Efecto sobre la IgE total en suero y sobre BALF de cobayas

20 Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5. El contenido total de IgE en suero y de BALF en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el contenido total de IgE en suero y de BALF en el grupo de dexametasona y en los grupos en dosis media y alta del fármaco de ensayo disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), lo que indica que tanto la dexametasona como el fármaco de
25 ensayo pueden inhibir la respuesta inflamatoria alérgica en el pulmón de cobaya y mejorar los síntomas asmáticos.

Tabla 5. Efecto de la Composición 5 sobre la IgE total en suero y sobre BALF de cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Suero (U/l)	BALF (U/l)
Grupo de control en blanco	-	10	2,01 ± 0,85	3,60 ± 0,81
Grupo de control modelo	-	10	5,63 ± 1,36**	5,30 ± 1,25**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	3,74 ± 1,32 ^{ΔΔ}	3,70 ± 0,73 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	5,13 ± 2,17	4,18 ± 1,59

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Suero (U/l)	BALF (U/l)
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	4,27 ± 1,11 ^Δ	3,90 ± 1,46 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	3,98 ± 1,13 ^{ΔΔ}	3,88 ± 0,94 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.3 Efecto sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. En comparación con el grupo de control en blanco, el nivel de recuento de EOS en las cobayas del grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el nivel de recuento de EOS en el grupo de control positivo y los grupos de dosis media y alta de fármaco de ensayo se redujo significativamente ($p < 0,01$), lo que indica que la Composición 5 es eficaz en el tratamiento del asma alérgico, posiblemente al reducir el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de las cobayas.

Tabla 6. Efecto de la Composición 5 sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	EOS (células/HP)
Grupo de control en blanco	-	10	5,23 ± 2,75
Grupo de control modelo	-	10	93,63 ± 14,91**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	30,77 ± 7,21 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	85,27 ± 12,09
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	70,27 ± 12,14 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	59,24 ± 11,68 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

4. Conclusiones

Los estudios experimentales con animales demuestran que la Composición 5 es capaz de mejorar significativamente los síntomas asmáticos en ratas y de prolongar el período de latencia del asma inducido en cobayas en los grupos modelo; de reducir el nivel de IL-4 en suero, de aumentar el nivel de IFN- γ en suero y corregir la proporción desequilibrada de IFN- γ /IL-4 en ratas con asma; de reducir el número de EOS en los tejidos pulmonares de las ratas y cobayas, y mejorar la infiltración de los EOS en las zonas inflamadas; de reducir el contenido total de IgE en suero y de BALF de las cobayas, y mejorar los síntomas inflamatorios pulmonares. Por lo tanto, la Composición 5 se considera eficaz en la resistencia al asma alérgico.

Ejemplo 60. Informe de experimentos con animales de la Composición 6 obtenida en el Ejemplo 6 contra la alergia y la dermatitis alérgica

1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

El fármaco de ensayo fue la Composición 6 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y *Flos rosae rugosae*) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 12,56 g de fármacos brutos totales. Su ingesta diaria recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal.

1.2 Animales de laboratorio

Igual que en Ejemplo 51.

1.3 Reactivos primarios

Igual que en Ejemplo 51.

1.4 Instrumentos primarios

Igual que en Ejemplo 51.

5 **2. Métodos experimentales**

2.1 Agrupamiento de animales

10 Se dividieron los animales aleatoriamente en grupos con 10 animales por grupo en función del peso corporal. Un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 6, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona).

2.2 Pauta posológica

15 La ingesta diaria de la Composición de fármaco 6 de ensayo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para un ratón fue: grupo de dosis baja: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 4,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 12,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 5, 10 y 30 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (15,925 mg de polvo seco/ml, 31,85 mg de polvo seco/ml y 95,55 mg de polvo seco/ml) con agua destilada para llevar a cabo los experimentos.

25 La ingesta diaria para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (7,96 mg de polvo seco/ml, 15,92 mg de polvo seco/ml y 47,76 mg de polvo seco/ml) con agua destilada para llevar a cabo los experimentos.

30 2.3 Efecto de la Composición 6 sobre la anafilaxia pasiva (PCA) en ratas causada por la ovoalbúmina

2.3.1 Preparación de antisuero

Igual que en Ejemplo 51.

35 2.3.2 Establecimiento de modelos de suero anti-ovoalbúmina de rata

40 Se tomó suero anti-ovoalbúmina y se diluyó a 1:4 o 1:8 con solución salina fisiológica. Se dividieron aleatoriamente 50 ratas en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 6, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratas por grupo. El grupo de control modelo recibió agua destilada por vía intragástrica; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 6 recibieron las soluciones de ensayo por vía intragástrica a diferentes concentraciones en un volumen de dosificación de 10 ml/kg; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 14 días consecutivos. El día 15, se afeitó el lomo de las ratas, y se inyectó por vía intradérmica un antisuero diluido en dos puntos de cada lado con 0,1 ml por punto.

45 Después de 48 horas, se inyectó en la vena de la cola de cada rata una solución mixta de 1,0 ml de azul de Evans al 1 % y de ovoalbúmina al 1 % en solución salina fisiológica. Después de 30 min, se extrajo sangre arterial, se aisló el suero de la misma y se determinó el contenido de histamina mediante el método^[2]. Se sacrificaron las ratas y se invirtió la piel del lomo para medir el diámetro de las manchas de reacción azules con el fin de determinar la diferencia entre los grupos de dosificación y el grupo modelo. Se fijó una muestra del tejido cutáneo de rata con formaldehído neutro, se deshidrató con un gradiente de alcohol, se embebió en parafina y se examinó para determinar la desgranulación de los mastocitos en el tejido^[3].

55 2.3.3 Efecto de la Composición 6 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno

60 Se dividieron aleatoriamente 50 ratones en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 6, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratones por grupo. Se aplicó una solución al 5 % de 2,4-dinitroclorobenceno en etanol sobre la piel abdominal (afeitada) de los ratones para la sensibilización. Se llevó a cabo la administración intragástrica dos días antes de la sensibilización; el grupo de control modelo recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de agua destilada; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 6 recibieron las soluciones de ensayo correspondientes por vía intragástrica a un volumen de dosis de 0,1 ml/10 g de peso corporal; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 10 días consecutivos. 7 días después de la sensibilización, se aplicó una solución al 1 % de 2,4-dinitroclorobenceno en la oreja derecha, y se sacrificaron los ratones tras 24 horas, y se cortaron ambas orejas a lo largo de la línea de base de la aurícula. Se perforaron discos que tenían un diámetro de 8 mm en la misma posición en ambas orejas, se

pesaron con precisión en una balanza electrónica, y se tomó la diferencia de peso entre la oreja izquierda y derecha como el valor de hipersensibilidad retardada.

2.3.4 Efecto de la Composición 6 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular

Se dividieron aleatoriamente los ratones en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 6, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratones por grupo. Se llevó a cabo la administración intragástrica a los ratones una vez al día durante 10 días consecutivos. 30 min después de la administración final, se inyectó una solución de dextrano de bajo peso molecular al 0,0125 % a 0,1 g/10 g en la vena de la cola. Se observó y registró el número de eventos de picazón (los eventos de picazón se indicaron al rascarse la cabeza con las patas delanteras, al rascarse el cuerpo con las patas traseras y al morder en varias partes del cuerpo) ocurrido en el transcurso de los 30 min posteriores a la inyección de la solución de dextrano de bajo peso molecular en las venas de la cola de los ratones de cada grupo.

2.3.5 Efecto de la Composición 6 sobre la permeabilidad capilar en ratas

Se dividieron aleatoriamente las ratas en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 6, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratas por grupo. El grupo de control modelo recibió agua destilada por vía intragástrica; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 6 recibieron las soluciones de ensayo por vía intragástrica a diferentes concentraciones en un volumen de dosificación de 10 ml/kg; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 10 días consecutivos. 1 hora después de la administración final, se inyectó en la zona afeitada (afeitada antes de la administración) del lomo de las ratas por vía intradérmica 1 mg/ml de fosfato de histamina a una dosis de 0,1 ml/rata, y luego se inyectó en la vena de la cola de inmediato una solución acuosa de azul de Evans al 1 % a una dosis de 1 ml/rata. Después de 20 minutos, se sacrificaron los animales por dislocación cervical. Se retiraron cortando las zonas de la piel con manchas azules y se cortaron en trozos pequeños, se empaparon en una solución de 5 ml de acetona:solución salina fisiológica (7:3) durante 48 horas, se centrifugaron, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 610 nm.

2.4 Método estadístico

Los datos experimentales se presentaron en $\bar{X} \pm S$. Se empleó un análisis ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre el grupo de control modelo y los grupos en varias dosis de la Composición 6. $p < 0,05$ se consideró como significativamente diferente. $p < 0,01$ se consideró como muy significativamente diferente.

3. Resultados

3.1 Efecto de la Composición 6 sobre la anafilaxia pasiva en ratas

Los resultados del ensayo se muestran en las Tablas 1 y 2. En comparación con el grupo de control modelo, el grupo de dosis baja de la Composición 6 mostró una tendencia a disminuir el diámetro de las manchas azules en ratas con sensibilidad al suero anti-ovoalbúmina a 1:4 y 1:8, a disminuir la desgranulación de los mastocitos y a disminuir el contenido de histamina en suero, que, sin embargo, no tuvo significación estadística; el grupo de control de prednisona y los grupos de dosis medias y altas de la Composición 6 mostraron un efecto de disminución significativa del diámetro de las manchas azules en ratas sensibilizadas con suero anti-ovoalbúmina a 1:4 y 1:8, reduciéndose la desgranulación de los mastocitos y reduciéndose el contenido de histamina en suero, con una diferencia estadística significativa o muy significativa. Esto indica que la Composición 6 tuvo un efecto inhibitorio significativo sobre la anafilaxia pasiva en ratas.

Tabla 1. Efecto de la Composición 6 sobre el diámetro de las manchas azules de PCA en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Diámetro de manchas azules (mm)	
			1:4	1:8
Grupo de control modelo	0,0	10	17,34 \pm 2,35	11,32 \pm 1,64
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	13,22 \pm 1,90**	8,65 \pm 1,52**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	15,78 \pm 2,02	10,56 \pm 1,43
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	14,61 \pm 2,32*	9,72 \pm 1,52*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	14,16 \pm 2,08**	9,10 \pm 1,29**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

Tabla 2. Efecto de la Composición 6 sobre la desgranulación de los mastocitos y el contenido de histamina en suero en ratas PCA ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Desgranulación	Fluorescencia de la histamina (mg/l)
Grupo de control modelo	0,0	10	58,42 ± 12,33	3,86 ± 0,82
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	19,80 ± 10,57**	2,07 ± 0,76**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	47,16 ± 12,72	3,10 ± 0,84
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	43,26 ± 11,42*	2,84 ± 0,80*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	33,60 ± 10,67**	2,21 ± 0,67**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

3.2 Efecto de la Composición 6 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno

Los resultados se muestran en la Tabla 3. En comparación con el grupo de control modelo, el grado de inflamación de los discos auriculares de los ratones disminuyó significativamente en los grupos de la dosis media y alta de Composición 6, lo que indica que la Composición 6 tuvo un buen efecto inhibitorio sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por 2,4-dinitroclorobenceno.

Tabla 3. Efecto de la Composición 6 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Grado de inflamación de los discos auriculares de ratón (mg)
Grupo de control modelo	0,0	10	6,67 ± 0,69
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	4,62 ± 0,79**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	2,0	10	6,05 ± 0,82
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	4,0	10	5,72 ± 0,84*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	12,0	10	5,07 ± 0,80**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

3.3 Efecto de la Composición 6 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular

Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 4. En comparación con el grupo de control modelo, el valor de DO disminuyó significativamente en los grupos de ratas de dosis media y alta de Composición 6, lo que indica que la Composición 6 fue significativamente eficaz en disminuir el aumento de la permeabilidad capilar en ratas causado por el fosfato de histamina.

Tabla 4. Efecto de la Composición 6 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Número de eventos de picazón (30 min)
Grupo de control modelo	0,0	10	27,38 ± 6,82
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	15,43 ± 4,56**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	2,0	10	22,39 ± 5,73
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	4,0	10	19,54 ± 6,02*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	12,0	10	17,27 ± 4,22**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

3.4 Efecto de la Composición 6 sobre la permeabilidad capilar en ratas

Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 5. En comparación con el grupo de control modelo, el valor de DO disminuyó significativamente en los grupos de ratas de dosis media y alta de Composición 6, lo que indica que la Composición 6 fue significativamente eficaz en disminuir el aumento de la permeabilidad capilar en ratas causado por el fosfato de histamina.

Tabla 5. Efecto de la Composición 6 sobre la permeabilidad capilar en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Valor de DO
Grupo de control modelo	0,0	10	1,037 \pm 0,108
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	0,773 \pm 0,109**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	0,969 \pm 0,136
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	0,924 \pm 0,121*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	0,860 \pm 0,090**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

4. Conclusiones

Los estudios experimentales en animales demuestran que la Composición 6 es significativamente eficaz en la inhibición de la anafilaxia pasiva en ratas causada por la ovoalbúmina, que la Composición 6 es eficaz en la inhibición de la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno y que la Composición 6 es significativamente eficaz en reducir el aumento de la permeabilidad capilar en las ratas causado por el fosfato de histamina. Los resultados anteriores indican una buena eficacia de la Composición 6 para resistir las alergias, y para prevenir y tratar enfermedades alérgicas tales como la dermatitis alérgica y la urticaria.

Ejemplo 61. Informe de experimentos con animales de la Composición 6 obtenida en el Ejemplo 6 contra la prevención y el tratamiento de la rinitis alérgica

1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

El fármaco de ensayo fue la Composición 6 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y *Flos rosae rugosae*) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 12,56 g de fármacos brutos totales.

1.2 Animales de laboratorio

Igual que en Ejemplo 52.

1.3 Reactivos primarios

Igual que en Ejemplo 52.

1.4 Instrumentos primarios

Igual que en Ejemplo 52.

2. Métodos experimentales

2.1 Efecto sobre la rinitis alérgica en ratas causada por la OVA

2.1.1 Agrupamiento de animales

Se dividieron aleatoriamente ratas en dos grupos, es decir, un grupo de control en blanco de 10 animales y un grupo de modelización de 70 animales. Tras una modelización exitosa, las ratas se dividieron aleatoriamente, en función de su puntuación, en los siguientes grupos: un grupo de control modelo, un grupo de positivo de fármaco (grupo de Bi-yan-kang) y los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 6, con 10 animales en cada grupo.

2.1.2 Pauta posológica

La ingesta diaria del material compuesto de la Composición de fármaco 6 de ensayo en polvo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. El grupo de control en blanco y el grupo modelo de rinitis alérgica recibieron por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica; el grupo de Bi-yan-kang recibió el fármaco a una dosis de 410 mg/kg. El volumen de administración intragástrica se calculó como 1,0 ml/100 g de peso corporal. La administración intragástrica se inició después de una modelización exitosa y se llevó a cabo una vez al día durante 21 días consecutivos.

2.1.3 Establecimiento de modelos animales de rinitis alérgica en ratas

Igual que en Ejemplo 52.

2.1.4 Indicadores de ensayo

Igual que en Ejemplo 52.

2.1.4.1 Medición del AMPc y GMPc en sangre

Igual que en Ejemplo 52.

2.1.4.2 Recuento de mastocitos de la mucosa nasal

Igual que en Ejemplo 52.

2.2 Efecto sobre la rinitis alérgica en cobayas causada por TDI

2.2.1. Igual que en 2.1.1.

2.2.2. Igual que en 2.1.2.

2.2.3 Establecimiento de modelos animales de rinitis alérgica en cobaya

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4 Indicadores de ensayo

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.1 Observación del comportamiento de las cobayas

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.2 Recuento de eosinófilos (EOS) en la secreción nasal

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.3 Medición de IgE en suero total e histamina en sangre

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.4 Medición del espesor de la mucosa nasal

Igual que en Ejemplo 52.

2.3 Método estadístico

Los datos experimentales se presentaron en $\bar{X} \pm S$. Se empleó un análisis ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre el grupo de control en blanco, el grupo de control modelo y los grupos en varias dosis de la Composición 6. $p < 0,05$ se consideró como significativamente diferente. $p < 0,01$ se consideró como muy significativamente diferente.

65

3. Resultados

3.1 Efecto de la Composición 6 sobre la rinitis alérgica en ratas causada por la ovoalbúmina

5 3.1.1 Efecto sobre el comportamiento de las ratas

Los resultados se muestran en la Tabla 2. Tras la modelización, se puntuaron los signos de las ratas de cada grupo modelizado sin que hubiera una diferencia significativa entre los mismos, lo que indicó una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, todas las puntuaciones de los signos de los grupos de dosis medias y altas del fármaco de ensayo y del grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$) y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

Tabla 2. Efecto de la Composición 6 sobre las puntuaciones de los síntomas de la rinitis alérgica en ratas antes y después de la dosificación ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación		
				Día 7	Día 14	Día 21
Grupo de control en blanco	10	-	0,33 \pm 0,29	0,44 \pm 0,26	0,39 \pm 0,21	0,35 \pm 0,19
Grupo de control modelo	10	-	6,71 \pm 1,49**	6,57 \pm 1,24**	7,10 \pm 1,35**	6,51 \pm 1,18**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	6,58 \pm 1,21**	3,21 \pm 0,97 $\Delta\Delta$	3,68 \pm 1,23 $\Delta\Delta$	2,95 \pm 1,02 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	6,75 \pm 1,18**	5,82 \pm 0,87	5,89 \pm 1,42	5,63 \pm 1,08
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	6,54 \pm 1,29**	5,40 \pm 1,24 Δ	5,31 \pm 1,45 Δ	4,57 \pm 1,43 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	6,75 \pm 1,14**	4,68 \pm 0,84 $\Delta\Delta$	4,45 \pm 1,38 $\Delta\Delta$	4,26 \pm 1,31 $\Delta\Delta$

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo de control en blanco; $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$ frente al grupo modelo.

15

3.1.2 Efecto de la Composición 6 sobre los niveles de AMPc y GMPc en suero en ratas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. En comparación con el grupo de control en blanco, el grupo modelo mostró una significativa disminución del nivel de AMPc en suero ($p < 0,01$) y un nivel significativamente aumentado de GMPc en suero ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, el grupo de Bi-yan-kang y todos los grupos de fármaco de ensayo mostraron un nivel de AMPc en suero significativamente aumentado ($p < 0,01$ o $p < 0,05$); el grupo de Bi-yan-kang y los grupos de dosis media y alta del fármaco de ensayo mostraron un nivel de GMPc en suero significativamente reducido ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

20

25

3.1.3 Efecto de la Composición 6 sobre los mastocitos en la mucosa nasal de rata

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. El número de mastocitos de la mucosa nasal en el grupo de control modelo aumentó significativamente con una diferencia altamente significativa ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, el número de mastocitos de la mucosa nasal en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con el fármaco de ensayo disminuyó significativamente con una diferencia significativa ($p < 0,01$).

30

35

Tabla 3. Efecto de la Composición 6 sobre los niveles de AMPc y GMPc en suero y de los mastocitos de la mucosa nasal en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	AMPc (pmol/ml)	GMPc (pmol/ml)	Recuento de mastocitos (células)
Grupo de control en blanco	-	10	19,98 \pm 4,96	9,72 \pm 2,64	1,69 \pm 1,41
Grupo de control modelo	-	10	10,27 \pm 3,85**	14,83 \pm 4,88**	14,33 \pm 4,75**
Grupo de Bi-yan-kang	0,41	10	18,25 \pm 3,62 $\Delta\Delta$	9,03 \pm 2,52 $\Delta\Delta$	5,87 \pm 2,23 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	14,13 \pm 3,91 Δ	12,40 \pm 4,01	8,64 \pm 3,51 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	15,86 \pm 5,23 Δ	10,58 \pm 2,84 Δ	7,79 \pm 3,18

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	AMPc (pmol/ml)	GMPc (pmol/ml)	Recuento de mastocitos (células)
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	17,74 ± 4,12 ^{ΔΔ}	9,25 ± 4,05 ^{ΔΔ}	6,56 ± 2,17 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2 Efecto de la Composición 6 sobre la rinitis alérgica en cobayas causada por TDI

3.2.1 Efecto sobre el comportamiento de las cobayas

5

Los resultados se muestran en la Tabla 4. Tras la modelización, se puntuaron los signos de las cobayas de cada grupo modelizado sin que hubiera una diferencia significativa entre los mismos, lo que indicó una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, todas las puntuaciones de los signos de los grupos de dosis medias y altas del fármaco de ensayo y del grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$) y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

10

Tabla 4. Efecto de la Composición 6 sobre las puntuaciones de los síntomas de la rinitis alérgica en cobayas antes y después de la dosificación ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación		
				Día 7	Día 14	Día 21
Grupo de control en blanco	10	-	0,54 ± 0,70	0,48 ± 0,33	0,35 ± 0,27	0,41 ± 0,63
Grupo de control modelo	10	-	6,27 ± 1,21**	6,3 ± 1,19**	6,53 ± 1,01**	6,01 ± 0,97**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	6,64 ± 1,08**	5,28 ± 0,86 ^Δ	5,35 ± 0,94 ^Δ	4,79 ± 1,25
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	6,56 ± 1,31**	5,31 ± 1,37	5,68 ± 0,93	5,04 ± 1,35
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	6,43 ± 1,09**	5,02 ± 1,29 ^Δ	4,74 ± 1,31 ^{ΔΔ}	4,51 ± 0,79 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	6,66 ± 1,12**	4,53 ± 1,08 ^{ΔΔ}	3,93 ± 0,82 ^{ΔΔ}	3,63 ± 0,92 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

15 3.2.2 Efecto de la histamina en sangre y de la IgE en suero total en cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5. En comparación con el grupo de control en blanco, aumentaron tanto la histamina en sangre como la IgE en suero total en el grupo modelo ($p < 0,01$), indicando una modelización experimental exitosa. En comparación con el grupo modelo, la absorbancia de la fluorescencia de la histamina y la concentración total de IgE en suero en los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo y en el grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), donde la histamina en los grupos de dosis media y alta disminuyó casi hasta el nivel normal, lo que indica que la Composición 6 fue eficaz en el tratamiento de la rinitis alérgica mediante la inhibición del nivel de histamina en sangre y de IgE en suero.

20

25 Tabla 5. Efecto de la Composición 6 sobre la histamina en sangre y de la IgE en suero total en cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Fluorescencia de la histamina (mg/l)	IgE (UI·ml ⁻¹)
Grupo de control en blanco	10	-	2,08 ± 0,41	0,124 ± 0,023
Grupo de control modelo	10	-	3,14 ± 0,91**	0,163 ± 0,037**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	2,14 ± 0,48 ^{ΔΔ}	0,121 ± 0,020 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	3,01 ± 0,46	0,137 ± 0,026
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	2,31 ± 0,45 ^Δ	0,127 ± 0,024 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	2,10 ± 0,39 ^{ΔΔ}	0,121 ± 0,019 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.3 Efecto sobre los eosinófilos (EOS) en la secreción nasal de cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. El número de eosinófilos en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el número de eosinófilos en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con el fármaco disminuyó significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$).

3.2.4 Efecto sobre el espesor de la mucosa nasal en cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. Como resultado, en comparación con el grupo de control en blanco, en el grupo modelo, se separó en diversos grados el epitelio de la mucosa sobre el tabique nasal de las cobayas, teniendo un espesor no uniforme y una estructura basal poco clara; las vénulas y los capilares de la lámina propia mostraron una aparente dilatación, el espacio tisular se expandió, y el espesor de la mucosa aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, los cambios patológicos anteriores en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con fármaco se aliviaron, y el espesor de la mucosa disminuyó significativamente ($p < 0,01$).

Tabla 6. Efecto de la Composición 6 sobre los EOS en la secreción nasal y en el espesor de la mucosa nasal en cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Número de EOS ($\times 10^9/l$)	Espesor de la mucosa (mm)
Grupo de control en blanco	-	10	$2,68 \pm 1,39$	$0,159 \pm 0,050$
Grupo de control modelo	-	10	$18,66 \pm 4,17^{**}$	$0,286 \pm 0,071^{**}$
Grupo de Bi-yan-kang	0,41	10	$10,30 \pm 3,81^{\Delta\Delta}$	$0,199 \pm 0,048^{\Delta\Delta}$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	$13,29 \pm 4,12^{\Delta\Delta}$	$0,216 \pm 0,047^{\Delta\Delta}$
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	$12,41 \pm 3,54^{\Delta\Delta}$	$0,195 \pm 0,068^{\Delta\Delta}$
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	$11,13 \pm 2,87^{\Delta\Delta}$	$0,196 \pm 0,063^{\Delta\Delta}$

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; $^{\Delta}p < 0,05$, $^{\Delta\Delta}p < 0,01$ frente al grupo modelo.

20 4. Conclusiones

Los estudios experimentales con animales demuestran que la eficacia de la Composición 6 se refleja principalmente en los siguientes aspectos: 1) es capaz de disminuir significativamente la puntuación de los síntomas nasales de las ratas modelizadas, aumentando el nivel de AMPc en suero y reduciendo el nivel de GMPc en ratas con rinitis alérgica; 2) reduce el número de mastocitos en la mucosa nasal de las ratas y reduce su infiltración en las zonas inflamadas; 3) es capaz de disminuir la puntuación de los síntomas nasales de las cobayas modelizadas; 4) disminuye el número de EOS en la secreción nasal de las cobayas y reduce la infiltración de los EOS en las zonas inflamadas; 5) es capaz de disminuir significativamente la concentración de histamina en sangre en las cobayas y de reducir los mediadores inflamatorios; 6) alivia la inflamación de la mucosa nasal de las cobayas. De acuerdo con los resultados de los estudios experimentales, se considera que la Composición 6 es eficaz para resistir la rinitis alérgica.

35 Ejemplo 62. Informe de experimentos con animales de la Composición 6 obtenida en el Ejemplo 6 contra la prevención y el tratamiento del asma alérgico

35 1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

40 El fármaco de ensayo fue la Composición 6 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y *Flos rosae rugosae*) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 12,56 g de fármacos brutos totales.

45 1.2 Animales de laboratorio

Igual que en Ejemplo 53.

1.3 Reactivos primarios

50 Igual que en Ejemplo 53.

1.4 Instrumentos primarios

Igual que en Ejemplo 53.

5 **2. Métodos experimentales**

2.1 Efecto sobre el asma alérgico en ratas causado por la OVA

2.1.1 Agrupamiento de animales

10 Las ratas (la mitad de las cuales era machos y la otra mitad era hembras) se dividieron aleatoriamente en dos grupos, es decir, un grupo de control en blanco de 10 animales y un grupo de modelización de 70 animales. Tras una modelización exitosa, las ratas se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos: un grupo de control modelo, un grupo positivo de fármaco (grupo de dexametasona) y los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 6, con 10 animales en cada grupo.

2.1.2 Establecimiento de modelos animales de asma alérgico en ratas

20 Igual que en Ejemplo 53.

2.1.3 Pauta posológica

25 La ingesta diaria del material compuesto de la Composición de fármaco 6 de ensayo en polvo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (7,96 mg de polvo seco/ml, 15,92 mg de polvo seco/ml, 47,77 mg de polvo seco/ml) para llevar a cabo los experimentos. El volumen de administración intragástrica se calculó como 1,0 ml/100 g de peso corporal. el grupo de control modelo recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica al 0,9 % 30 min antes de la exposición; y el grupo de fármaco positivo recibió dexametasona a una dosis de 0,5 mg/kg 30 min antes de cada desafío^[2]. Los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 6 recibieron cada uno por vía intragástrica la dosis respectiva del fármaco de ensayo 30 min antes de cada exposición. Al mismo tiempo, el grupo de control en blanco recibió por inyección intraperitoneal, se expuso a la atomización con o recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica al 0,9 %. La administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 21 días consecutivos.

2.1.4 Registro del período latente del asma en ratas

40 Igual que en Ejemplo 53.

2.1.5 Mediciones de los niveles de IL-4 e IFN- γ

45 Igual que en Ejemplo 53.

2.1.6 Medición del contenido de EOS en los tejidos pulmonares

Igual que en Ejemplo 53.

50 2.2 Efecto sobre el asma alérgico en cobayas causado por un gas mixto de Ach e His

2.2.1. Igual que en 2.1.1.

2.2.2 Establecimiento de modelos animales de asma alérgico en cobayas

55 Igual que en Ejemplo 53.

2.2.3 Pauta posológica

Igual que en 2.1.3.

60 2.2.4 Registro del período latente del asma

Igual que en 2.1.4.1.

65 2.2.5 Medición de la IgE en suero y de BALF

Igual que en Ejemplo 53.

2.3 Método estadístico

5 Igual que en Ejemplo 53.

3 Resultados

3.1 Efecto de la Composición 6 sobre el asma alérgico en ratas causado por la OVA

10

3.1.1 Efecto sobre el período latente del asma inducido en ratas

15

Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se puntuaron los períodos latentes de asma inducido en ratas de cada grupo modelizado, sin una diferencia significativa entre ellos, lo que indica una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, los períodos latentes de asma inducido en las ratas del grupo de control positivo y los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo se prolongaron significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$).

Tabla 1. Efecto de la Composición 6 sobre el período latente del asma inducido en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación
Grupo de control en blanco	10	-	360	360
Grupo de control modelo	10	-	77,23 \pm 13,81**	75,52 \pm 12,88**
Grupo de control positivo	10	0,5 mg/kg	74,67 \pm 11,10**	159,78 \pm 20,27 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	75,62 \pm 15,31**	85,01 \pm 21,33
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	78,51 \pm 14,09**	96,52 \pm 23,67 Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	78,58 \pm 17,14**	112,30 \pm 25,8647 $\Delta\Delta$

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$ frente al grupo modelo.

20

3.1.2 Efecto sobre los niveles de IL-4 e IFN- γ en ratas

25

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 2. En comparación con el grupo de control en blanco, el grupo modelo mostró una significativa disminución del nivel de IFN- γ en suero ($p < 0,01$), pero un nivel significativamente aumentado de IL-4 en suero ($p < 0,01$), lo que indica un gran desequilibrio de la proporción de IFN- γ /IL-4 durante los ataques de asma. En comparación con el grupo modelo, el grupo de dexametasona y los grupos de dosis media y alta del fármaco de ensayo mostraron un nivel de IL-4 significativamente reducido ($p < 0,05$ o $p < 0,01$) y un nivel de IFN- γ significativamente mayor ($p < 0,05$ o $p < 0,01$), lo que indica que el fármaco de ensayo puede corregir la proporción desequilibrada de IFN- γ /IL-4.

30

Tabla 2. Efecto de la Composición 6 sobre los niveles de IL-4 e IFN- γ en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	IL-4 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
Grupo de control en blanco	-	10	12,71 \pm 2,52	24,31 \pm 4,19
Grupo de control modelo	-	10	22,43 \pm 3,57**	11,83 \pm 3,48**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	13,50 \pm 4,32 $\Delta\Delta$	20,27 \pm 4,89 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	20,56 \pm 3,19	13,79 \pm 3,75
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	18,23 \pm 4,12 Δ	15,61 \pm 3,81 Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	16,11 \pm 3,38 $\Delta\Delta$	17,35 \pm 4,92 $\Delta\Delta$

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.1.3 Efecto sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de rata

35

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. El número de EOS en ratas en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el grupo de control positivo y los grupos de dosis media y alta de fármaco de ensayo mostraron un número significativamente reducido de EOS ($p < 0,01$), lo que

indica que la Composición 6 es eficaz en el tratamiento del asma alérgico, posiblemente al reducir el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de las ratas.

Tabla 3. Efecto de la Composición 6 sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de rata ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	EOS (células/HP)
Grupo de control en blanco	-	10	2,22 ± 0,86
Grupo de control modelo	-	10	103,61 ± 13,93**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	28,40 ± 4,25 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	93,22 ± 11,28
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	78,11 ± 10,36 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	65,20 ± 8,47 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

5

3.2 Efecto de la Composición 6 sobre el asma alérgico en cobayas causado por un gas mixto de Ach e His

3.2.1 Efecto sobre el período latente del asma inducido en cobayas

- 10 Los resultados se muestran en la Tabla 4. Tras la modelización, se puntuaron los períodos latentes de asma inducido en cobayas de cada grupo modelizado, sin una diferencia significativa entre ellos, lo que indica una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, los períodos latentes de asma inducido en las cobayas del grupo de control positivo y los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo se prolongaron significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$), lo que indica que la Composición 6
- 15 aumenta enormemente los síntomas asmáticos en las cobayas.

Tabla 4. Efecto de la Composición 6 sobre el período latente del asma inducido en cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación
Grupo de control en blanco	10	-	360	360
Grupo de control modelo	10	-	76,17 ± 10,81**	77,01 ± 10,95**
Grupo de control positivo	10	0,5 mg/kg	75,62 ± 9,10**	155,78 ± 16,29 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	76,52 ± 14,31**	83,02 ± 21,31
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	77,80 ± 15,09**	97,51 ± 24,78 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	79,71 ± 19,12**	110,68 ± 24,91 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.2 Efecto sobre la IgE total en suero y sobre BALF de cobayas

20

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5. El contenido total de IgE en suero y de BALF en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el contenido total de IgE en suero y de BALF en el grupo de dexametasona y en los grupos en dosis media y alta del fármaco de ensayo disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), lo que indica que tanto la dexametasona como el fármaco de

25 ensayo pueden inhibir la respuesta inflamatoria alérgica en el pulmón de cobaya y mejorar los síntomas asmáticos.

Tabla 5. Efecto de la Composición 6 sobre la IgE total en suero y sobre BALF de cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Suero (U/l)	BALF (U/l)
Grupo de control en blanco	-	10	2,08 ± 0,81	3,60 ± 0,85
Grupo de control modelo	-	10	5,61 ± 1,38**	5,30 ± 1,26**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	3,74 ± 1,30 ^{ΔΔ}	3,71 ± 0,70 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	5,10 ± 2,19	4,13 ± 1,56

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Suero (U/l)	BALF (U/l)
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	4,24 ± 1,12 ^Δ	3,91 ± 1,47 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	4,03 ± 1,04 ^{ΔΔ}	3,87 ± 0,91 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.3 Efecto sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. En comparación con el grupo de control en blanco, el nivel de recuento de EOS en las cobayas del grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el nivel de recuento de EOS en el grupo de control positivo y los grupos de dosis media y alta de fármaco de ensayo se redujo significativamente ($p < 0,01$), lo que indica que la Composición 6 es eficaz en el tratamiento del asma alérgico, posiblemente al reducir el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de las cobayas.

Tabla 6. Efecto de la Composición 6 sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	EOS (células/HP)
Grupo de control en blanco	-	10	5,22 ± 2,86
Grupo de control modelo	-	10	93,61 ± 14,95**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	30,80 ± 7,23 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	82,29 ± 12,21
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	66,26 ± 12,02 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	59,2137 ± 10,66 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

4. Conclusiones

Los estudios experimentales con animales demuestran que la Composición 6 es capaz de mejorar significativamente los síntomas asmáticos en ratas y de prolongar el período de latencia del asma inducido en cobayas en los grupos modelo; de reducir el nivel de IL-4 en suero, de aumentar el nivel de IFN- γ en suero y corregir la proporción desequilibrada de IFN- γ /IL-4 en ratas con asma; de reducir el número de EOS en los tejidos pulmonares de las ratas y cobayas, y mejorar la infiltración de los EOS en las zonas inflamadas; de reducir el contenido total de IgE en suero y de BALF de las cobayas, y mejorar los síntomas inflamatorios pulmonares. Por lo tanto, la Composición 6 se considera eficaz en la resistencia al asma alérgico.

Ejemplo 63. Informe de experimentos con animales de la Composición 7 obtenida en el Ejemplo 7 contra la alergia y la dermatitis alérgica

1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

El fármaco de ensayo fue la Composición 7 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma*, *Cordyceps* y *Flos rosae rugosae*) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 12,19 g de fármacos brutos totales. Su ingesta diaria recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal.

1.2 Animales de laboratorio

Igual que en Ejemplo 51.

1.3 Reactivos primarios

Igual que en Ejemplo 51.

1.4 Instrumentos primarios

Igual que en Ejemplo 51.

5 **2. Métodos experimentales**

2.1 Agrupamiento de animales

10 Se dividieron los animales aleatoriamente en grupos con 10 animales por grupo en función del peso corporal. Un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 7, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona).

2.2 Pauta posológica

15 La ingesta diaria de la Composición de fármaco 7 de ensayo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para un ratón fue: grupo de dosis baja: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 4,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 12,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 5, 10 y 30 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (16,405 mg de polvo seco/ml, 32,81 mg de polvo seco/ml y 98,43 mg de polvo seco/ml) con agua destilada para llevar a cabo los experimentos.

25 La ingesta diaria para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (8,205 mg de polvo seco/ml, 16,41 mg de polvo seco/ml y 49,23 mg de polvo seco/ml) con agua destilada para llevar a cabo los experimentos.

30 2.3 Efecto de la Composición 7 sobre la anafilaxia pasiva (PCA) en ratas causada por la ovoalbúmina

2.3.1 Preparación de antisuero

Igual que en Ejemplo 51.

35 2.3.2 Establecimiento de los modelos de suero anti-ovoalbúmina de rata

40 Se tomó suero anti-ovoalbúmina y se diluyó a 1:4 o 1:8 con solución salina fisiológica. Se dividieron aleatoriamente 50 ratas en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 7, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratas por grupo. El grupo de control modelo recibió agua destilada por vía intragástrica; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 7 recibieron las soluciones de ensayo por vía intragástrica a diferentes concentraciones en un volumen de dosificación de 10 ml/kg; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 14 días consecutivos. El día 15, se afeitó el lomo de las ratas, y se inyectó por vía intradérmica un antisuero diluido en dos puntos de cada lado con 0,1 ml por punto.

45 Después de 48 horas, se inyectó en la vena de la cola de cada rata una solución mixta de 1,0 ml de azul de Evans al 1 % y de ovoalbúmina al 1 % en solución salina fisiológica. Después de 30 min, se extrajo sangre arterial, se aisló el suero de la misma y se determinó el contenido de histamina mediante el método^[2]. Se sacrificaron las ratas y se invirtió la piel del lomo para medir el diámetro de las manchas de reacción azules con el fin de determinar la diferencia entre los grupos de dosificación y el grupo modelo. Se fijó una muestra del tejido cutáneo de rata con formaldehído neutro, se deshidrató con un gradiente de alcohol, se embebió en parafina y se examinó para determinar la desgranulación de los mastocitos en el tejido^[3].

55 2.3.3 Efecto de la Composición 7 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno^[4]

60 Se dividieron aleatoriamente 50 ratones en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 7, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratones por grupo. Se aplicó una solución al 5 % de 2,4-dinitroclorobenceno en etanol sobre la piel abdominal (afeitada) de los ratones para la sensibilización. Se llevó a cabo la administración intragástrica dos días antes de la sensibilización; el grupo de control modelo recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de agua destilada; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 7 recibieron las soluciones de ensayo correspondientes por vía intragástrica a un volumen de dosis de 0,1 ml/10 g de peso corporal; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 10 días consecutivos. 7 días después de la sensibilización, se aplicó una solución al 1 % de 2,4-dinitroclorobenceno en la oreja derecha, y se sacrificaron los ratones tras 24 horas, y se cortaron ambas orejas a lo largo de la línea de base de la aurícula. Se perforaron discos que tenían un diámetro de 8 mm en la misma posición en ambas orejas, se

pesaron con precisión en una balanza electrónica, y se tomó la diferencia de peso entre la oreja izquierda y derecha como el valor de hipersensibilidad retardada.

2.3.4 Efecto de la Composición 7 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular^[5]

Se dividieron aleatoriamente los ratones en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 7, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratones por grupo. Se llevó a cabo la administración intragástrica a los ratones una vez al día durante 10 días consecutivos. 30 min después de la administración final, se inyectó una solución de dextrano de bajo peso molecular al 0,0125 % a 0,1 g/10 g en la vena de la cola. Se observó y registró el número de eventos de picazón (los eventos de picazón se indicaron al rascarse la cabeza con las patas delanteras, al rascarse el cuerpo con las patas traseras y al morder en varias partes del cuerpo) ocurrido en el transcurso de los 30 min posteriores a la inyección de la solución de dextrano de bajo peso molecular en las venas de la cola de los ratones de cada grupo.

2.3.5 Efecto de la Composición 7 sobre la permeabilidad capilar en ratas^[6]

Se dividieron aleatoriamente las ratas en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 7, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratas por grupo. El grupo de control modelo recibió agua destilada por vía intragástrica; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 7 recibieron las soluciones de ensayo por vía intragástrica a diferentes concentraciones en un volumen de dosificación de 10 ml/kg; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 10 días consecutivos. 1 hora después de la administración final, se inyectó en la zona afeitada (afeitada antes de la administración) del lomo de las ratas por vía intradérmica 1 mg/ml de fosfato de histamina a una dosis de 0,1 ml/rata, y luego se inyectó en la vena de la cola de inmediato una solución acuosa de azul de Evans al 1 % a una dosis de 1 ml/rata. Después de 20 minutos, se sacrificaron los animales por dislocación cervical. Se retiraron cortando las zonas de la piel con manchas azules y se cortaron en trozos pequeños, se empaparon en una solución de 5 ml de acetona:solución salina fisiológica (7:3) durante 48 horas, se centrifugaron, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 610 nm.

2.4 Método estadístico

Los datos experimentales se presentaron en $\bar{X} \pm S$. Se empleó un análisis ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre el grupo de control modelo y los grupos en varias dosis de la Composición 7. $p < 0,05$ se consideró como significativamente diferente. $p < 0,01$ se consideró como muy significativamente diferente.

3. Resultados

3.1 Efecto de la Composición 7 sobre la anafilaxia pasiva en ratas

Los resultados del ensayo se muestran en las Tablas 1 y 2. En comparación con el grupo de control modelo, el grupo de dosis baja de la Composición 7 mostró una tendencia a disminuir el diámetro de las manchas azules en ratas con sensibilidad al suero anti-ovoalbúmina a 1:4 y 1:8, a disminuir la desgranulación de los mastocitos y a disminuir el contenido de histamina en suero, que, sin embargo, no tuvo significación estadística; el grupo de control de prednisona y los grupos de dosis medias y altas de la Composición 7 mostraron un efecto de disminución significativa del diámetro de las manchas azules en ratas sensibilizadas con suero anti-ovoalbúmina a 1:4 y 1:8, reduciéndose la desgranulación de los mastocitos y reduciéndose el contenido de histamina en suero, con una diferencia estadística significativa o muy significativa. Esto indica que la Composición 7 tuvo un efecto inhibitorio significativo sobre la anafilaxia pasiva en ratas.

Tabla 1. Efecto de la Composición 7 sobre el diámetro de las manchas azules de PCA en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Diámetro de manchas azules (mm)	
			1:4	1:8
Grupo de control modelo	0,0	10	17,50 ± 2,27	11,66 ± 1,92
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	12,48 ± 2,16**	8,32 ± 1,63**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	15,65 ± 2,44	10,55 ± 1,78
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	14,80 ± 2,02*	9,70 ± 1,39*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	13,68 ± 2,50**	9,02 ± 1,56**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

Tabla 2. Efecto de la Composición 7 sobre la desgranulación de los mastocitos y el contenido de histamina en suero en ratas PCA ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Desgranulación	Fluorescencia de la histamina
Grupo de control modelo	0,0	10	59,60 \pm 12,88	3,95 \pm 0,95
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	17,54 \pm 11,23**	2,11 \pm 0,70**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	48,20 \pm 12,54	3,24 \pm 0,82
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	44,17 \pm 11,96*	2,96 \pm 0,77*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	32,54 \pm 10,03**	2,32 \pm 0,69**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

3.2 Efecto de la Composición 7 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno

Los resultados se muestran en la Tabla 3. En comparación con el grupo de control modelo, el grado de inflamación de los discos auriculares de los ratones disminuyó significativamente en los grupos de la dosis media y alta de Composición 7, lo que indica que la Composición 7 tuvo un buen efecto inhibitor sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por 2,4-dinitroclorobenceno.

Tabla 3. Efecto de la Composición 7 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Grado de inflamación de los discos auriculares de ratón (mg)
Grupo de control modelo	0,0	10	6,95 \pm 0,77
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	4,84 \pm 0,70**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	2,0	10	6,23 \pm 0,89
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	4,0	10	5,90 \pm 0,80*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	12,0	10	5,21 \pm 0,85**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

3.3 Efecto de la Composición 7 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular

Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 4. En comparación con el grupo de control modelo, el valor de DO disminuyó significativamente en los grupos de ratas de dosis media y alta de Composición 7, lo que indica que la Composición 7 fue significativamente eficaz en disminuir el aumento de la permeabilidad capilar en ratas causado por el fosfato de histamina.

Tabla 4. Efecto de la Composición 7 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Número de eventos de picazón (30 min)
Grupo de control modelo	0,0	10	28,42 \pm 6,08
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	15,57 \pm 5,33**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	2,0	10	23,44 \pm 6,21
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	4,0	10	20,38 \pm 6,92*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	12,0	10	17,62 \pm 5,06**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

3.4 Efecto de la Composición 7 sobre la permeabilidad capilar en ratas

Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 5. En comparación con el grupo de control modelo, el valor de DO disminuyó significativamente en los grupos de ratas de dosis media y alta de Composición 7, lo que indica que la Composición 7 fue significativamente eficaz en disminuir el aumento de la permeabilidad capilar en ratas causado por el fosfato de histamina.

Tabla 5. Efecto de la Composición 7 sobre la permeabilidad capilar en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Valor de DO
Grupo de control modelo	0,0	10	0,943 \pm 0,086
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	0,662 \pm 0,090**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	0,885 \pm 0,102
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	0,832 \pm 0,088*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	0,724 \pm 0,095**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

4. Conclusiones

Los estudios experimentales en animales demuestran que la Composición 7 es significativamente eficaz en la inhibición de la anafilaxia pasiva en ratas causada por la ovoalbúmina, que la Composición 7 es eficaz en la inhibición de la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno y que la Composición 7 es significativamente eficaz en reducir el aumento de la permeabilidad capilar en las ratas causado por el fosfato de histamina. Los resultados anteriores indican una buena eficacia de la Composición 7 para resistir las alergias, y para prevenir y tratar enfermedades alérgicas tales como la dermatitis alérgica y la urticaria.

Ejemplo 64. Informe de experimentos con animales de la Composición 7 obtenida en el Ejemplo 7 contra la prevención y el tratamiento de la rinitis alérgica

1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

El fármaco de ensayo fue la Composición 7 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma*, *Cordyceps* y *Flos rosae rugosae*) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 12,19 g de fármacos brutos totales.

1.2 Animales de laboratorio

Igual que en Ejemplo 52.

1.3 Reactivos primarios

Igual que en Ejemplo 52.

1.4 Instrumentos primarios

Igual que en Ejemplo 52.

2. Métodos experimentales

2.1 Efecto sobre la rinitis alérgica en ratas causada por la OVA

2.1.1 Agrupamiento de animales

Se dividieron aleatoriamente ratas en dos grupos, es decir, un grupo de control en blanco de 10 animales y un grupo de modelización de 70 animales. Tras una modelización exitosa, las ratas se dividieron aleatoriamente, en función de su puntuación, en los siguientes grupos: un grupo de control modelo, un grupo de positivo de fármaco (grupo de Bi-yan-kang) y los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 7, con 10 animales en cada grupo.

2.1.2 Pauta posológica

La ingesta diaria del material compuesto de la Composición de fármaco 7 de ensayo en polvo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. El grupo de control en blanco y el grupo modelo de rinitis alérgica recibieron por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica; el grupo de Bi-yan-kang recibió el fármaco a una dosis de 410 mg/kg. El volumen de administración intragástrica se calculó como 1,0 ml/100 g de peso corporal. La administración intragástrica se inició después de una modelización exitosa y se llevó a cabo una vez al día durante 21 días consecutivos.

2.1.3 Establecimiento de modelos animales de rinitis alérgica en ratas

Igual que en Ejemplo 52.

2.1.4 Indicadores de ensayo

Igual que en Ejemplo 52.

2.1.4.1 Medición del AMPc y GMPc en sangre

Igual que en Ejemplo 52.

2.1.4.2 Recuento de mastocitos de la mucosa nasal

Igual que en Ejemplo 52.

2.2 Efecto sobre la rinitis alérgica causada por TDI en cobayas

2.2.1. Igual que en 2.1.1.

2.2.2. Igual que en 2.1.2.

2.2.3 Establecimiento de modelos animales de rinitis alérgica en cobaya

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4 Indicadores de ensayo

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.1 Observación del comportamiento de las cobayas

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.2 Recuento de eosinófilos (EOS) en la secreción nasal

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.3 Medición de IgE en suero total e histamina en sangre

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.4 Medición del espesor de la mucosa nasal

Igual que en Ejemplo 52.

2.3 Método estadístico

Los datos experimentales se presentaron en $\bar{X} \pm S$. Se empleó un análisis ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre el grupo de control en blanco, el grupo de control modelo y los grupos en varias dosis de la Composición 7. $p < 0,05$ se consideró como significativamente diferente. $p < 0,01$ se consideró como muy significativamente diferente.

3. Resultados

3.1 Efecto de la Composición 7 sobre la rinitis alérgica en ratas causada por la ovoalbúmina

3.1.1 Efecto sobre el comportamiento de las ratas

5 Los resultados se muestran en la Tabla 2. Tras la modelización, se puntuaron los signos de las ratas de cada grupo modelizado sin que hubiera una diferencia significativa entre los mismos, lo que indicó una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, todas las puntuaciones de los signos de los grupos de dosis medias y altas del fármaco de ensayo y del grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$) y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

10

Tabla 2. Efecto de la Composición 7 sobre las puntuaciones de los síntomas de la rinitis alérgica en ratas antes y después de la dosificación ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación		
				Día 7	Día 14	Día 21
Grupo de control en blanco	10	-	0,34 ± 0,30	0,41 ± 0,23	0,38 ± 0,21	0,32 ± 0,15
Grupo de control modelo	10	-	6,69 ± 1,51**	6,61 ± 1,28**	6,91 ± 1,31**	6,51 ± 1,18**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	6,62 ± 1,23**	3,22 ± 0,97 ^{ΔΔ}	3,68 ± 1,22 ^{ΔΔ}	2,93 ± 1,01 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	6,72 ± 1,16**	5,81 ± 0,86	5,75 ± 1,41	5,60 ± 1,07
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	6,51 ± 1,32**	5,28 ± 1,21 ^Δ	5,31 ± 1,44	4,54 ± 1,46 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	6,71 ± 1,09**	4,68 ± 0,81 ^{ΔΔ}	4,41 ± 1,37 ^{ΔΔ}	4,22 ± 1,36 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo de control en blanco; $p < 0,05$, $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.1.2 Efecto de la Composición 7 sobre los niveles de AMPc y GMPc en suero en ratas

15

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. En comparación con el grupo de control en blanco, el grupo modelo mostró una significativa disminución del nivel de AMPc en suero ($p < 0,01$) y un nivel significativamente aumentado de GMPc en suero ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, el grupo de Bi-yan-kang y todos los grupos de fármaco de ensayo mostraron un nivel de AMPc en suero significativamente aumentado ($p < 0,01$ o $p < 0,05$); el grupo de Bi-yan-kang y los grupos de dosis media y alta del fármaco de ensayo mostraron un nivel de GMPc en suero significativamente reducido ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

20

3.1.3 Efecto de la Composición 7 sobre los mastocitos en la mucosa nasal de rata

25

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. El número de mastocitos de la mucosa nasal en el grupo de control modelo aumentó significativamente con una diferencia altamente significativa ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, el número de mastocitos de la mucosa nasal en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con el fármaco de ensayo disminuyó significativamente con una diferencia significativa ($p < 0,01$).

30

Tabla 3. Efecto de la Composición 7 sobre los niveles de AMPc y GMPc en suero y de los mastocitos de la mucosa nasal en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	AMPc (pmol/ml)	GMPc (pmol/ml)	Recuento de mastocitos (células)
Grupo de control en blanco	-	10	20,06 ± 4,99	9,81 ± 2,67	1,70 ± 1,39
Grupo de control modelo	-	10	10,31 ± 3,89**	14,84 ± 4,88**	14,28 ± 4,71**
Grupo de Bi-yan-kang	0,41	10	18,31 ± 3,62 ^{ΔΔ}	9,01 ± 2,49 ^{ΔΔ}	5,87 ± 2,21 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	14,01 ± 3,99	12,43 ± 3,94	9,83 ± 3,54 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	15,84 ± 5,22 ^Δ	10,61 ± 2,83 ^Δ	8,75 ± 3,20 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	17,73 ± 4,10 ^{ΔΔ}	9,21 ± 3,97 ^{ΔΔ}	6,53 ± 2,08 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2 Efecto de la Composición 7 sobre la rinitis alérgica en cobayas causada por TDI

3.2.1 Efecto sobre el comportamiento de las cobayas

5 Los resultados se muestran en la Tabla 4. Tras la modelización, se puntuaron los signos de las cobayas de cada grupo modelizado sin que hubiera una diferencia significativa entre los mismos, lo que indicó una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, todas las puntuaciones de los signos de los grupos de dosis medias y altas del fármaco de ensayo y del grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$) y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

10 Tabla 4. Efecto de la Composición 7 sobre las puntuaciones de los síntomas de la rinitis alérgica en cobayas antes y después de la dosificación ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación		
				Día 7	Día 14	Día 21
Grupo de control en blanco	10	-	0,50 ± 0,62	0,43 ± 0,31	0,38 ± 0,20	0,42 ± 0,65
Grupo de control modelo	10	-	6,29 ± 1,21**	6,48 ± 1,16**	6,53 ± 1,01**	6,02 ± 0,98**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	6,62 ± 1,11**	5,32 ± 0,89 ^Δ	5,31 ± 0,93 ^Δ	4,78 ± 1,29 ^Δ
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	6,53 ± 1,30**	5,31 ± 1,36	5,71 ± 0,99	5,02 ± 1,31
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	6,41 ± 1,09**	5,02 ± 1,29 ^Δ	4,77 ± 1,31 ^{ΔΔ}	4,51 ± 0,79 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	6,71 ± 1,12**	4,57 ± 1,08 ^{ΔΔ}	3,92 ± 0,82 ^{ΔΔ}	3,69 ± 0,91 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.2 Efecto de la histamina en sangre y de la IgE en suero total en cobayas

15 Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5. En comparación con el grupo de control en blanco, aumentaron tanto la histamina en sangre como la IgE en suero total en el grupo modelo ($p < 0,01$), indicando una modelización experimental exitosa. En comparación con el grupo modelo, la absorbancia de la fluorescencia de la histamina y la concentración total de IgE en suero en los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo y en el grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), donde la histamina en los grupos de dosis media y alta disminuyó casi hasta el nivel normal, lo que indica que la Composición 7 fue eficaz en el tratamiento de la rinitis alérgica mediante la inhibición del nivel de histamina en sangre y de IgE en suero.

20 Tabla 5. Efecto de la Composición 7 sobre la histamina en sangre y de la IgE en suero total en cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Fluorescencia de la histamina (mg/l)	IgE (UI·ml ⁻¹)
Grupo de control en blanco	10	-	2,15 ± 0,41	0,122 ± 0,021
Grupo de control modelo	10	-	3,16 ± 0,91**	0,161 ± 0,035**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	2,14 ± 0,48 ^{ΔΔ}	0,120 ± 0,025 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	3,02 ± 0,47	0,137 ± 0,029
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	2,31 ± 0,44 ^Δ	0,127 ± 0,026 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	2,12 ± 0,39 ^{ΔΔ}	0,120 ± 0,010 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.3 Efecto sobre los eosinófilos (EOS) en la secreción nasal de cobayas

25 Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. El número de eosinófilos en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el número de eosinófilos en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con el fármaco disminuyó significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$).

30

3.2.4 Efecto sobre el espesor de la mucosa nasal en cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. Como resultado, en comparación con el grupo de control en blanco, en el grupo modelo, se separó en diversos grados el epitelio de la mucosa sobre el tabique nasal de las cobayas, teniendo un espesor no uniforme y una estructura basal poco clara; las vénulas y los capilares de la lámina propia mostraron una aparente dilatación, el espacio tisular se expandió, y el espesor de la mucosa aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, los cambios patológicos anteriores en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con fármaco se aliviaron, y el espesor de la mucosa disminuyó significativamente ($p < 0,01$).

Tabla 6. Efecto de la Composición 7 sobre los EOS en la secreción nasal y en el espesor de la mucosa nasal en cobayas ($\bar{X} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Número de EOS ($\times 10^9/l$)	Espesor de la mucosa (mm)
Grupo de control en blanco	-	10	2,60 \pm 1,36	0,157 \pm 0,052
Grupo de control modelo	-	10	17,52 \pm 4,21**	0,284 \pm 0,070**
Grupo de Bi-yan-kang	0,41	10	12,28 \pm 3,81 $\Delta\Delta$	0,197 \pm 0,045 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	12,29 \pm 4,13 $\Delta\Delta$	0,204 \pm 0,049 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	11,41 \pm 3,57 $\Delta\Delta$	0,184 \pm 0,066 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	10,13 \pm 2,86 Δ	0,166 \pm 0,068 $\Delta\Delta$

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$ frente al grupo modelo.

4. Conclusiones

Los estudios experimentales con animales demuestran que la eficacia de la Composición 7 se refleja principalmente en los siguientes aspectos: 1) es capaz de disminuir significativamente la puntuación de los síntomas nasales de las ratas modelizadas, aumentando el nivel de AMPc en suero y reduciendo el nivel de GMPc en ratas con rinitis alérgica; 2) reduce el número de mastocitos en la mucosa nasal de las ratas y reduce su infiltración en las zonas inflamadas; 3) es capaz de disminuir la puntuación de los síntomas nasales de las cobayas modelizadas; 4) disminuye el número de EOS en la secreción nasal de las cobayas y reduce la infiltración de los EOS en las zonas inflamadas; 5) es capaz de disminuir significativamente la concentración de histamina en sangre en las cobayas y de reducir los mediadores inflamatorios; 6) alivia la inflamación de la mucosa nasal de las cobayas. De acuerdo con los resultados de los estudios experimentales, se considera que la Composición 7 es eficaz para resistir la rinitis alérgica.

Ejemplo 65. Informe de experimentos con animales de la Composición 7 obtenida en el Ejemplo 7 contra la prevención y el tratamiento del asma alérgico

1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

El fármaco de ensayo fue la Composición 7 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma*, *Cordyceps* y *Flos rosae rugosae*) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 12,19 g de fármacos brutos totales.

1.2 Animales de laboratorio

Igual que en Ejemplo 53.

1.3 Reactivos primarios

Igual que en Ejemplo 53.

1.4 Instrumentos primarios

Igual que en Ejemplo 53.

2. Métodos experimentales

2.1 Efecto sobre el asma alérgico en ratas causado por la OVA

2.1.1 Agrupamiento de animales

5 Las ratas (la mitad de las cuales era machos y la otra mitad era hembras) se dividieron aleatoriamente en dos grupos, es decir, un grupo de control en blanco de 10 animales y un grupo de modelización de 70 animales. Tras una modelización exitosa, las ratas se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos: un grupo de control modelo, un grupo positivo de fármaco (grupo de dexametasona) y los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 7, con 10 animales en cada grupo.

10 2.1.2 Establecimiento de modelos animales de asma alérgico en ratas

Igual que en Ejemplo 53.

15 2.1.3 Pauta posológica

La ingesta diaria del material compuesto de la Composición de fármaco 7 de ensayo en polvo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 20 15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (8,20 mg de polvo seco/ml, 16,41 mg de polvo seco/ml, 49,22 mg de polvo seco/ml) para llevar a cabo los experimentos. El volumen de administración intragástrica se calculó como 1,0 ml/100 g de peso corporal. el grupo de control modelo recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica al 0,9 % 30 min antes de la exposición; y el grupo de fármaco positivo recibió dexametasona a una dosis de 0,5 mg/kg 30 min antes de cada desafío¹². Los grupos de baja, media y alta 25 dosis de Composición 7 recibieron cada uno por vía intragástrica la dosis respectiva del fármaco de ensayo 30 min antes de cada exposición. Al mismo tiempo, el grupo de control en blanco recibió por inyección intraperitoneal, se expuso a la atomización con o recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica al 0,9 %. La administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 21 días consecutivos.

30 2.1.4 Registro del período latente del asma en ratas

Igual que en Ejemplo 53.

35 2.1.5 Mediciones de los niveles de IL-4 e IFN- γ

Igual que en Ejemplo 53.

40 2.1.6 Medición del contenido de EOS en los tejidos pulmonares

Igual que en Ejemplo 53.

2.2 Efecto sobre el asma alérgico en cobayas causado por un gas mixto de Ach e His

45 2.2.1. Igual que en 2.1.1.

2.2.2 Establecimiento de modelos animales de asma alérgico en cobayas

Igual que en Ejemplo 53.

50 2.2.3 Pauta posológica

Igual que en 2.1.3.

55 2.2.4 Registro del período latente del asma

Igual que en 2.1.4.1.

2.2.5 Medición de la IgE en suero y de BALF

60 Igual que en Ejemplo 53.

2.3 Método estadístico

Igual que en Ejemplo 53.

65

3. Resultados

3.1 Efecto de la Composición 7 sobre el asma alérgico en ratas causado por la OVA

3.1.1 Efecto sobre el período latente del asma inducido en ratas

- 5 Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se puntuaron los períodos latentes de asma inducido en ratas de cada grupo modelizado, sin una diferencia significativa entre ellos, lo que indica una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, los períodos latentes de asma inducido en las ratas del grupo de control positivo y los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo se prolongaron significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$).

10

Tabla 1. Efecto de la Composición 7 sobre el período latente del asma inducido en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación
Grupo de control en blanco	10	-	360	360
Grupo de control modelo	10	-	75,46 ± 13,57**	76,92 ± 12,05**
Grupo de control positivo	10	0,5 mg/kg	72,88 ± 10,96**	156,30 ± 21,44 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	73,72 ± 14,20**	86,27 ± 20,88
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	72,65 ± 14,33**	95,64 ± 22,62 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	73,19 ± 13,36**	102,68 ± 23,89 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.1.2 Efecto sobre los niveles de IL-4 e IFN-γ en ratas

- 15 Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 2. En comparación con el grupo de control en blanco, el grupo modelo mostró una significativa disminución del nivel en suero de IFN-γ ($p < 0,01$), pero un aumento significativo del nivel de IL-4 en suero ($p < 0,01$), lo que indica un grave desequilibrio de la proporción de IFN-γ/IL-4 durante los ataques de asma. En comparación con el grupo modelo, el grupo de dexametasona y los grupos de dosis media y alta del fármaco de ensayo mostraron un nivel de IL-4 significativamente reducido ($p < 0,05$ o $p < 0,01$) y un nivel de IFN-γ significativamente mayor ($p < 0,05$ o $p < 0,01$), lo que indica que el fármaco de ensayo puede corregir la proporción desequilibrada de IFN-γ/IL-4.

20

Tabla 2. Efecto de la Composición 7 sobre los niveles de IL-4 e IFN-γ en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	IL-4 (pg/ml)	IFN-γ (pg/ml)
Grupo de control en blanco	-	10	12,84 ± 2,66	23,87 ± 4,26
Grupo de control modelo	-	10	22,18 ± 3,09**	12,45 ± 3,35**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	12,90 ± 4,67 ^{ΔΔ}	19,29 ± 4,04 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	20,21 ± 3,56	13,66 ± 3,21
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	18,90 ± 4,06 ^Δ	15,87 ± 3,26 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	16,97 ± 3,54 ^{ΔΔ}	18,92 ± 4,24 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

25 3.1.3 Efecto sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de rata

- Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. El número de EOS en ratas en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el grupo de control positivo y los grupos de dosis media y alta de fármaco de ensayo mostraron un número significativamente reducido de EOS ($p < 0,01$), lo que indica que la Composición 7 es eficaz en el tratamiento del asma alérgico, posiblemente al reducir el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de las ratas.

30

Tabla 3. Efecto de la Composición 7 sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de rata ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	EOS (células/HP)
Grupo de control en blanco	-	10	2,60 ± 0,92
Grupo de control modelo	-	10	105,72 ± 14,56**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	35,64 ± 6,18 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	93,76 ± 11,90
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	79,47 ± 12,08 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	68,6 ± 8,32 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2 Efecto de la Composición 7 sobre el asma alérgico en cobayas causado por un gas mixto de Ach e His

5 3.2.1 Efecto sobre el período latente del asma inducido en cobayas

Los resultados se muestran en la Tabla 4. Tras la modelización, se puntuaron los períodos latentes de asma inducido en cobayas de cada grupo modelizado, sin una diferencia significativa entre ellos, lo que indica una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, los períodos latentes de asma inducido en las cobayas del grupo de control positivo y los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo se prolongaron significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$), lo que indica que la Composición 7 aumenta enormemente los síntomas asmáticos en las cobayas.

Tabla 4. Efecto de la Composición 7 sobre el período latente del asma inducido en cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación
Grupo de control en blanco	10	-	360	360
Grupo de control modelo	10	-	74,33 ± 11,26**	72,87 ± 11,21**
Grupo de control positivo	10	0,5 mg/kg	70,68 ± 9,65**	150,46 ± 16,80 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	72,92 ± 10,65**	82,96 ± 21,65
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	73,67 ± 11,86**	96,44 ± 20,27 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	75,42 ± 10,45**	113,35 ± 25,92 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

15 3.2.2 Efecto sobre la IgE total en suero y sobre BALF de cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5. El contenido total de IgE en suero y de BALF en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el contenido total de IgE en suero y de BALF en el grupo de dexametasona y en los grupos en dosis media y alta del fármaco de ensayo disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), lo que indica que tanto la dexametasona como el fármaco de ensayo pueden inhibir la respuesta inflamatoria alérgica en el pulmón de cobaya y mejorar los síntomas asmáticos.

Tabla 5. Efecto de la Composición 7 sobre la IgE total en suero y sobre BALF de cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Suero (U/l)	BALF (U/l)
Grupo de control en blanco	-	10	2,04 ± 0,83	3,72 ± 0,76
Grupo de control modelo	-	10	5,69 ± 1,22**	5,41 ± 1,38**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	3,70 ± 1,26 ^{ΔΔ}	3,50 ± 0,78 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	5,24 ± 2,45	4,36 ± 1,21
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	4,28 ± 1,02 ^Δ	3,88 ± 1,49 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	3,95 ± 1,34 ^{ΔΔ}	3,65 ± 0,91 ^{ΔΔ}

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Suero (U/l)	BALF (U/l)
--------	----------------------------------	--------------------	-------------	------------

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.3 Efecto sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. En comparación con el grupo de control en blanco, el nivel de recuento de EOS en las cobayas del grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el nivel de recuento de EOS en el grupo de control positivo y los grupos de dosis media y alta de fármaco de ensayo se redujo significativamente ($p < 0,01$), lo que indica que la Composición 7 es eficaz en el tratamiento del asma alérgico, posiblemente al reducir el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de las cobayas.

Tabla 6. Efecto de la Composición 7 sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	EOS (células/HP)
Grupo de control en blanco	-	10	5,40 ± 2,67
Grupo de control modelo	-	10	90,613 ± 13,25**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	31,70 ± 9,52 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	86,80 ± 11,93
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	75,60 ± 13,41 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	55,72 ± 15,54 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

4. Conclusiones

Los estudios experimentales con animales demuestran que la Composición 7 es capaz de mejorar significativamente los síntomas asmáticos en ratas y de prolongar el período de latencia del asma inducido en cobayas en los grupos modelo; de reducir el nivel de IL-4 en suero, de aumentar el nivel de IFN- γ en suero y corregir la proporción desequilibrada de IFN- γ /IL-4 en ratas con asma; de reducir el número de EOS en los tejidos pulmonares de las ratas y cobayas, y mejorar la infiltración de los EOS en las zonas inflamadas; de reducir el contenido total de IgE en suero y de BALF de las cobayas, y mejorar los síntomas inflamatorios pulmonares. Por lo tanto, la Composición 7 se considera eficaz en la resistencia al asma alérgico.

Ejemplo 66. Informe de experimentos con animales de la Composición 8 obtenida en el Ejemplo 8 contra la alergia y la dermatitis alérgica

1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

El fármaco de ensayo fue la Composición 8 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado, *Flos rosae rugosae* y *Cordyceps*) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 13,78 g de fármacos brutos totales. Su ingesta diaria recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal.

1.2 Animales de laboratorio

Igual que en Ejemplo 51.

1.3 Reactivos primarios

Igual que en Ejemplo 51.

1.4 Instrumentos primarios

Igual que en Ejemplo 51.

2. Métodos experimentales

2.1 Agrupamiento de animales

Se dividieron los animales aleatoriamente en grupos con 10 animales por grupo en función del peso corporal. Un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 8, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona).

2.2 Pauta posológica

La ingesta diaria de la Composición de fármaco 8 de ensayo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para un ratón fue: grupo de dosis baja: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 4,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 12,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 5, 10 y 30 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (14,515 mg de polvo seco/ml, 29,03 mg de polvo seco/ml y 87,09 mg de polvo seco/ml) con agua destilada para llevar a cabo los experimentos.

La ingesta diaria para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (7,255 mg de polvo seco/ml, 14,51 mg de polvo seco/ml y 43,53 mg de polvo seco/ml) con agua destilada para llevar a cabo los experimentos.

2.3 Efecto de la Composición 8 sobre la anafilaxia pasiva (PCA) en ratas causada por la ovoalbúmina

2.3.1 Preparación de antisuero

Igual que en Ejemplo 51.

2.3.2 Establecimiento de los modelos de suero anti-ovoalbúmina de rata^[1]

Se tomó suero anti-ovoalbúmina y se diluyó a 1:4 o 1:8 con solución salina fisiológica. Se dividieron aleatoriamente 50 ratas en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 8, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratas por grupo. El grupo de control modelo recibió agua destilada por vía intragástrica; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 8 recibieron las soluciones de ensayo por vía intragástrica a diferentes concentraciones en un volumen de dosificación de 10 ml/kg; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 14 días consecutivos. El día 15, se afeitó el lomo de las ratas, y se inyectó por vía intradérmica un antisuero diluido en dos puntos de cada lado con 0,1 ml por punto. Después de 48 horas, se inyectó en la vena de la cola de cada rata una solución mixta de 1,0 ml de azul de Evans al 1 % y de ovoalbúmina al 1 % en solución salina fisiológica. Después de 30 min, se extrajo sangre arterial, se aisló el suero de la misma y se determinó el contenido de histamina mediante el método^[2]. Se sacrificaron las ratas y se invirtió la piel del lomo para medir el diámetro de las manchas de reacción azules con el fin de determinar la diferencia entre los grupos de dosificación y el grupo modelo. Se fijó una muestra del tejido cutáneo de rata con formaldehído neutro, se deshidrató con un gradiente de alcohol, se embebió en parafina y se examinó para determinar la desgranulación de los mastocitos en el tejido^[3].

2.3.3 Efecto de la Composición 8 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno^[4]

Se dividieron aleatoriamente 50 ratones en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 8, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratones por grupo. Se aplicó una solución al 5 % de 2,4-dinitroclorobenceno en etanol sobre la piel abdominal (afeitada) de los ratones para la sensibilización. Se llevó a cabo la administración intragástrica dos días antes de la sensibilización; el grupo de control modelo recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de agua destilada; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 8 recibieron las soluciones de ensayo correspondientes por vía intragástrica a un volumen de dosis de 0,1 ml/10 g de peso corporal; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 10 días consecutivos. 7 días después de la sensibilización, se aplicó una solución al 1 % de 2,4-dinitroclorobenceno en la oreja derecha, y se sacrificaron los ratones tras 24 horas, y se cortaron ambas orejas a lo largo de la línea de base de la aurícula. Se perforaron discos que tenían un diámetro de 8 mm en la misma posición en ambas orejas, se pesaron con precisión en una balanza electrónica, y se tomó la diferencia de peso entre la oreja izquierda y derecha como el valor de hipersensibilidad retardada.

2.3.4 Efecto de la Composición 8 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular^[5]

Se dividieron aleatoriamente los ratones en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y

alta dosis de la Composición 8, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratones por grupo. Se llevó a cabo la administración intragástrica a los ratones una vez al día durante 10 días consecutivos. 30 min después de la administración final, se inyectó una solución de dextrano de bajo peso molecular al 0,0125 % a 0,1 g/10 g en la vena de la cola. Se observó y registró el número de eventos de picazón (los eventos de picazón se indicaron al rascarse la cabeza con las patas delanteras, al rascarse el cuerpo con las patas traseras y al morder en varias partes del cuerpo) ocurrido en el transcurso de los 30 min posteriores a la inyección de la solución de dextrano de bajo peso molecular en las venas de la cola de los ratones de cada grupo.

2.3.5 Efecto de la Composición 8 sobre la permeabilidad capilar en ratas^[6]

Se dividieron aleatoriamente las ratas en 5 grupos, es decir, un grupo de control modelo, grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 8, y un grupo de control positivo de fármaco (prednisona), con 10 ratas por grupo. El grupo de control modelo recibió agua destilada por vía intragástrica; el grupo de control positivo de fármaco recibió prednisona por vía intragástrica a una dosis de 5 mg/kg; los grupos de baja, media y alta dosis de la Composición 8 recibieron las soluciones de ensayo por vía intragástrica a diferentes concentraciones en un volumen de dosificación de 10 ml/kg; la administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 10 días consecutivos. 1 hora después de la administración final, se inyectó en la zona afeitada (afeitada antes de la administración) del lomo de las ratas por vía intradérmica 1 mg/ml de fosfato de histamina a una dosis de 0,1 ml/rata, y luego se inyectó en la vena de la cola de inmediato una solución acuosa de azul de Evans al 1 % a una dosis de 1 ml/rata. Después de 20 minutos, se sacrificaron los animales por dislocación cervical. Se retiraron cortando las zonas de la piel con manchas azules y se cortaron en trozos pequeños, se empaparon en una solución de 5 ml de acetona:solución salina fisiológica (7:3) durante 48 horas, se centrifugaron, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 610 nm.

2.4 Método estadístico

Igual que en Ejemplo 51.

3. Resultados

3.1 Efecto de la Composición 8 sobre la anafilaxia pasiva en ratas

Los resultados del ensayo se muestran en las Tablas 1 y 2. En comparación con el grupo de control modelo, el grupo de dosis baja de la Composición 8 mostró una tendencia a disminuir el diámetro de las manchas azules en ratas con sensibilidad al suero anti-ovoalbúmina a 1:4 y 1:8, a disminuir la desgranulación de los mastocitos y a disminuir el contenido de histamina en suero, que, sin embargo, no tuvo significación estadística; el grupo de control de prednisona y los grupos de dosis medias y altas de la Composición 8 mostraron un efecto de disminución significativa del diámetro de las manchas azules en ratas sensibilizadas con suero anti-ovoalbúmina a 1:4 y 1:8, reduciéndose la desgranulación de los mastocitos y reduciéndose el contenido de histamina en suero, con una diferencia estadística significativa o muy significativa. Esto indica que la Composición 8 tuvo un efecto inhibitorio significativo sobre la anafilaxia pasiva en ratas.

Tabla 1. Efecto de la Composición 8 sobre el diámetro de las manchas azules de PCA en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales -	Diámetro de manchas azules (mm)	
			1:4	1:8
Grupo de control modelo	0,0	10	18,14 ± 3,08	11,93 ± 2,17
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	12,82 ± 2,62**	8,54 ± 1,82**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	16,27 ± 2,75	10,81 ± 1,64
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	15,04 ± 2,80*	9,94 ± 1,47*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	13,89 ± 2,62**	9,36 ± 1,80**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

Tabla 2. Efecto de la Composición 8 sobre la desgranulación de los mastocitos y el contenido de histamina en suero en ratas PCA ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Desgranulación	Fluorescencia de la histamina (mg/l)
Grupo de control modelo	0,0	10	60,24 ± 12,47	4,28 ± 0,87
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	17,95 ± 11,82**	2,25 ± 0,76**
Grupo de dosis baja de	1,2	10	49,72 ± 10,98	3,52 ± 0,80

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Desgranulación	Fluorescencia de la histamina (mg/l)
fármaco de ensayo				
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	45,90 ± 11,04*	3,30 ± 0,69*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	33,16 ± 10,56**	2,54 ± 0,83**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

3.2 Efecto de la Composición 8 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno

5 Los resultados se muestran en la Tabla 3. En comparación con el grupo de control modelo, el grado de inflamación de los discos auriculares de los ratones disminuyó significativamente en los grupos de la dosis media y alta de Composición 8, lo que indica que la Composición 8 tuvo un buen efecto inhibitor sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por 2,4-dinitroclorobenceno.

10 Tabla 3. Efecto de la Composición 8 sobre la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Grado de inflamación de los discos auriculares de ratón (mg)
Grupo de control modelo	0,0	10	6,73 ± 0,65
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	4,60 ± 0,82**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	2,0	10	6,04 ± 0,97
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	4,0	10	5,82 ± 0,83*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	12,0	10	5,08 ± 0,64**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

3.3 Efecto de la Composición 8 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular

15 Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 4. En comparación con el grupo de control modelo, el valor de DO disminuyó significativamente en los grupos de ratas de dosis media y alta de Composición 8, lo que indica que la Composición 8 fue significativamente eficaz en disminuir el aumento de la permeabilidad capilar en ratas causado por el fosfato de histamina.

20 Tabla 4. Efecto de la Composición 8 sobre la picazón local en ratones causada por dextrano de bajo peso molecular ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Número de eventos de picazón (30 min)
Grupo de control modelo	0,0	10	26,60 ± 6,22
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	14,88 ± 5,08**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	2,0	10	21,53 ± 5,21
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	4,0	10	18,94 ± 6,04*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	12,0	10	15,62 ± 4,78**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

3.4 Efecto de la Composición 8 sobre la permeabilidad capilar en ratas

25 Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 5. En comparación con el grupo de control modelo, el valor de DO disminuyó significativamente en los grupos de ratas de dosis media y alta de Composición 8, lo que indica que la Composición 8 fue significativamente eficaz en disminuir el aumento de la permeabilidad capilar en ratas causado por el fosfato de histamina.

30

Tabla 5. Efecto de la Composición 8 sobre la permeabilidad capilar en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Valor de DO
Grupo de control modelo	0,0	10	0,962 ± 0,069
Grupo de control positivo	5,0 mg	10	0,662 ± 0,073**
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,2	10	0,890 ± 0,084
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,4	10	0,856 ± 0,089*
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	7,2	10	0,724 ± 0,097**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control modelo.

4. Conclusiones

- 5 Los estudios experimentales en animales demuestran que la Composición 8 es significativamente eficaz en la inhibición de la anafilaxia pasiva en ratas causada por la ovoalbúmina, que la Composición 8 es eficaz en la inhibición de la hipersensibilidad retardada en la piel de la oreja de ratón causada por el 2,4-dinitroclorobenceno y que la Composición 8 es significativamente eficaz en reducir el aumento de la permeabilidad capilar en las ratas causado por el fosfato de histamina. Los resultados anteriores indican una buena eficacia de la Composición 8 para resistir las alergias, y para prevenir y tratar enfermedades alérgicas tales como la dermatitis alérgica y la urticaria.

Ejemplo 67. Informe de experimentos con animales de la Composición 8 obtenida en el Ejemplo 8 contra la prevención y el tratamiento de la rinitis alérgica

15 1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

20 El fármaco de ensayo fue la Composición 8 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado, *Flos rosae rugosae* y *Cordyceps*) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 13,78 g de fármacos brutos totales.

25 1.2 Animales de laboratorio

Igual que en Ejemplo 52.

1.3 Reactivos primarios

30 Igual que en Ejemplo 52.

1.4 Instrumentos primarios

35 Igual que en Ejemplo 52.

2. Métodos experimentales

2.1 Efecto sobre la rinitis alérgica en ratas causada por la OVA

40 2.1.1 Agrupamiento de animales

Se dividieron aleatoriamente ratas en dos grupos, es decir, un grupo de control en blanco de 10 animales y un grupo de modelización de 70 animales. Tras una modelización exitosa, las ratas se dividieron aleatoriamente, en función de su puntuación, en los siguientes grupos: un grupo de control modelo, un grupo de positivo de fármaco (grupo de Bi-yan-kang) y los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 8, con 10 animales en cada grupo.

2.1.2 Pauta posológica

50 La ingesta diaria del material compuesto de la Composición de fármaco 8 de ensayo en polvo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y

15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (7,26 mg de polvo seco/ml, 14,51 mg de polvo seco/ml y 43,54 mg de polvo seco/ml) con agua destilada para llevar a cabo los experimentos. El volumen de administración intragástrica se calculó como 1,0 ml/100 g de peso corporal. El grupo de control en blanco y el grupo modelo de rinitis alérgica recibieron por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica; el grupo de Bi-yan-kang recibió el fármaco a una dosis de 410 mg/kg. La administración intragástrica se inició después de una modelización exitosa y se llevó a cabo una vez al día durante 21 días consecutivos.

2.1.3 Establecimiento de modelos animales de rinitis alérgica en ratas

Igual que en Ejemplo 52.

2.1.4 Indicadores de ensayo

Igual que en Ejemplo 52.

2.1.4.1 Medición del AMPc y GMPc en sangre

Igual que en Ejemplo 52.

2.1.4.2 Recuento de mastocitos de la mucosa nasal

Igual que en Ejemplo 52.

2.2 Efecto sobre la rinitis alérgica causada por TDI en cobayas

2.2.1. Igual que en 2.1.1.

2.2.2. Igual que en 2.1.2.

2.2.3 Establecimiento de modelos animales de rinitis alérgica en cobaya

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4 Indicadores de ensayo

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.1 Observación del comportamiento de las cobayas

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.2 Recuento de eosinófilos (EOS) en la secreción nasal

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.3 Medición de IgE en suero total e histamina en sangre

Igual que en Ejemplo 52.

2.2.4.4 Medición del espesor de la mucosa nasal

Igual que en Ejemplo 52.

2.3 Método estadístico

Los datos experimentales se presentaron en $\bar{X} \pm S$. Se empleó un análisis ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre el grupo de control en blanco, el grupo de control modelo y los grupos en varias dosis de la Composición 8. $p < 0,05$ se consideró como significativamente diferente. $p < 0,01$ se consideró como muy significativamente diferente.

3. Resultados

3.1 Efecto de la Composición 8 sobre la rinitis alérgica en ratas causada por la ovoalbúmina

3.1.1 Efecto sobre el comportamiento de las ratas

Los resultados se muestran en la Tabla 2. Tras la modelización, se puntuaron los signos de las ratas de cada grupo modelizado sin que hubiera una diferencia significativa entre los mismos, lo que indicó una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, todas las puntuaciones de los signos de los grupos de dosis medias y altas del fármaco de ensayo y del grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$) y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

Tabla 2. Efecto de la Composición 8 sobre las puntuaciones de los síntomas de la rinitis alérgica en ratas antes y después de la dosificación ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación		
				Día 7	Día 14	Día 21
Grupo de control en blanco	10	-	0,36 \pm 0,38	0,44 \pm 0,23	0,35 \pm 0,29	0,35 \pm 0,16
Grupo de control modelo	10	-	6,78 \pm 1,62**	6,70 \pm 1,37**	6,98 \pm 1,42**	6,64 \pm 1,06**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	6,53 \pm 1,14**	3,14 \pm 0,98 $\Delta\Delta$	3,77 \pm 1,14 $\Delta\Delta$	2,76 \pm 0,98 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	6,84 \pm 1,25**	5,90 \pm 0,75	5,72 \pm 1,29	5,78 \pm 1,16
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	6,42 \pm 1,44**	5,37 \pm 1,33 Δ	5,23 \pm 1,53 Δ	4,26 \pm 1,35 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	6,79 \pm 1,18**	4,76 \pm 0,92 $\Delta\Delta$	4,30 \pm 1,26 $\Delta\Delta$	4,34 \pm 1,23 $\Delta\Delta$

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo de control en blanco; $p < 0,05$, $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

10 3.1.2 Efecto de la Composición 8 sobre los niveles de AMPc y GMPc en suero en ratas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. En comparación con el grupo de control en blanco, el grupo modelo mostró una significativa disminución del nivel de AMPc en suero ($p < 0,01$) y un nivel significativamente aumentado de GMPc en suero ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, el grupo de Bi-yan-kang y todos los grupos de fármaco de ensayo mostraron un nivel de AMPc en suero significativamente aumentado ($p < 0,01$ o $p < 0,05$); el grupo de Bi-yan-kang y los grupos de dosis media y alta del fármaco de ensayo mostraron un nivel de GMPc en suero significativamente reducido ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

20 3.1.3 Efecto de la Composición 8 sobre los mastocitos en la mucosa nasal de rata

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. El número de mastocitos de la mucosa nasal en el grupo de control modelo aumentó significativamente con una diferencia altamente significativa ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, el número de mastocitos de la mucosa nasal en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con el fármaco de ensayo disminuyó significativamente con una diferencia significativa ($p < 0,01$).

Tabla 3. Efecto de la Composición 8 sobre los niveles de AMPc y GMPc en suero y de los mastocitos de la mucosa nasal en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	AMPc (pmol/ml)	GMPc (pmol/ml)	Recuento de mastocitos (células)
Grupo de control en blanco	-	10	20,24 \pm 4,87	9,88 \pm 2,56	1,74 \pm 1,38
Grupo de control modelo	-	10	10,20 \pm 3,90**	14,95 \pm 4,96**	14,39 \pm 4,83**
Grupo de Bi-yan-kang	0,41	10	18,40 \pm 3,49 $\Delta\Delta$	9,08 \pm 2,36 $\Delta\Delta$	5,76 \pm 2,09 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	14,25 \pm 3,80 Δ	12,55 \pm 3,85	9,71 \pm 3,57 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	15,95 \pm 5,34 Δ	10,70 \pm 2,72 Δ	8,87 \pm 3,11 $\Delta\Delta$
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	16,85 \pm 4,19 $\Delta\Delta$	9,10 \pm 3,86 $\Delta\Delta$	6,64 \pm 2,16 $\Delta\Delta$

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$ frente al grupo modelo.

30

3.2 Efecto de la Composición 8 sobre la rinitis alérgica en cobayas causada por TDI

3.2.1 Efecto sobre el comportamiento de las cobayas

Los resultados se muestran en la Tabla 4. Tras la modelización, se puntuaron los signos de las cobayas de cada grupo modelizado sin que hubiera una diferencia significativa entre los mismos, lo que indicó una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, todas las puntuaciones de los signos de los grupos de dosis medias y altas del fármaco de ensayo y del grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$) y el grupo de dosis baja también mostró una tendencia a disminuir.

Tabla 4. Efecto de la Composición 8 sobre las puntuaciones de los síntomas de la rinitis alérgica en cobayas antes y después de la dosificación ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación		
				Día 7	Día 14	Día 21
Grupo de control en blanco	10	-	0,55 ± 0,71	0,41 ± 0,42	0,31 ± 0,39	0,45 ± 0,61
Grupo de control modelo	10	-	6,18 ± 1,32**	6,57 ± 1,27**	6,64 ± 1,12**	6,10 ± 0,86**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	6,73 ± 1,07**	5,24 ± 0,60 ^Δ	5,72 ± 0,82 ^Δ	4,98 ± 1,18 ^Δ
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	6,64 ± 1,20**	5,46 ± 1,25	5,59 ± 0,88	5,13 ± 1,42
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	6,52 ± 1,17**	5,13 ± 1,38 ^Δ	4,66 ± 1,42 ^{ΔΔ}	4,20 ± 0,87 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	6,79 ± 1,23**	4,46 ± 1,17 ^{ΔΔ}	3,83 ± 0,74 ^{ΔΔ}	3,77 ± 0,83 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.2 Efecto de la histamina en sangre y de la IgE en suero total en cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5. En comparación con el grupo de control en blanco, aumentaron tanto la histamina en sangre como la IgE en suero total en el grupo modelo ($p < 0,01$), indicando una modelización experimental exitosa. En comparación con el grupo modelo, la absorbancia de la fluorescencia de la histamina y la concentración total de IgE en suero en los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo y en el grupo de Bi-yan-kang disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), donde la histamina en los grupos de dosis media y alta disminuyó casi hasta el nivel normal, lo que indica que la Composición 8 fue eficaz en el tratamiento de la rinitis alérgica mediante la inhibición del nivel de histamina en sangre y de IgE en suero.

Tabla 5. Efecto de la Composición 8 sobre la histamina en sangre y de la IgE en suero total en cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Fluorescencia de la histamina (mg/l)	IgE (UI·ml ⁻¹)
Grupo de control en blanco	10	-	2,04 ± 0,45	0,128 ± 0,032
Grupo de control modelo	10	-	3,25 ± 0,98**	0,172 ± 0,044**
Grupo de Bi-yan-kang	10	0,41	2,03 ± 0,37 ^{ΔΔ}	0,112 ± 0,014 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	3,10 ± 0,55	0,146 ± 0,038
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	2,42 ± 0,32 ^Δ	0,138 ± 0,015 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	2,19 ± 0,28 ^{ΔΔ}	0,130 ± 0,020 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.3 Efecto sobre los eosinófilos (EOS) en la secreción nasal de cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. El número de eosinófilos en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el número de eosinófilos en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con el fármaco disminuyó significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$).

3.2.4 Efecto sobre el espesor de la mucosa nasal en cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. Como resultado, en comparación con el grupo de control en blanco, en el grupo modelo, se separó en diversos grados el epitelio de la mucosa sobre el tabique nasal de las cobayas, teniendo un espesor no uniforme y una estructura basal poco clara; las vénulas y los capilares de la lámina propia mostraron una aparente dilatación, el espacio tisular se expandió, y el espesor de la mucosa aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, los cambios patológicos anteriores en el grupo de Bi-yan-kang y en los grupos de tratamiento con fármaco se aliviaron, y el espesor de la mucosa disminuyó significativamente ($p < 0,01$).

Tabla 6. Efecto de la Composición 8 sobre los EOS en la secreción nasal y en el espesor de la mucosa nasal en cobayas ($\bar{X} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Número de EOS ($\times 10^9/l$)	Espesor de la mucosa (mm)
Grupo de control en blanco	-	10	2,63 \pm 1,02	0,151 \pm 0,055
Grupo de control modelo	-	10	18,77 \pm 4,28**	0,289 \pm 0,082**
Grupo de Bi-yan-kang	0,41	10	13,19 \pm 3,70 ^{ΔΔ}	0,188 \pm 0,039 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	13,38 \pm 4,21 ^{ΔΔ}	0,188 \pm 0,058 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	13,52 \pm 3,46 ^{ΔΔ}	0,182 \pm 0,079 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	12,24 \pm 2,70 ^{ΔΔ}	0,177 \pm 0,071 ^{ΔΔ}

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

4. Conclusiones

Los estudios experimentales con animales demuestran que la eficacia de la Composición 8 se refleja principalmente en los siguientes aspectos: 1) es capaz de disminuir significativamente la puntuación de los síntomas nasales de las ratas modelizadas, aumentando el nivel de AMPc en suero y reduciendo el nivel de GMPc en ratas con rinitis alérgica; 2) reduce el número de mastocitos en la mucosa nasal de las ratas y reduce su infiltración en las zonas inflamadas; 3) es capaz de disminuir la puntuación de los síntomas nasales de las cobayas modelizadas; 4) disminuye el número de EOS en la secreción nasal de las cobayas y reduce la infiltración de los EOS en las zonas inflamadas; 5) es capaz de disminuir significativamente la concentración de histamina en sangre en las cobayas y de reducir los mediadores inflamatorios; 6) alivia la inflamación de la mucosa nasal de las cobayas. De acuerdo con los resultados de los estudios experimentales, se considera que la Composición 8 es eficaz para resistir la rinitis alérgica.

Ejemplo 68. Informe de experimentos con animales de la Composición 8 obtenida en el Ejemplo 8 contra la prevención y el tratamiento del asma alérgico

1. Materiales y métodos

1.1 Fuentes de muestras

El fármaco de ensayo fue la Composición 8 (*Radix panacis quinquefolii*, *Ganoderma*, *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado, *Flos rosae rugosae* y *Cordyceps*) proporcionada por Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd. en forma de un material compuesto en polvo. 1 g de material compuesto en polvo seco era equivalente a 13,78 g de fármacos brutos totales.

1.2 Animales de laboratorio

Igual que en Ejemplo 53.

1.3 Reactivos primarios

Igual que en Ejemplo 53.

1.4 Instrumentos primarios

Igual que en Ejemplo 53.

2. Métodos experimentales

2.1 Efecto sobre el asma alérgico en ratas causado por la OVA

2.1.1 Agrupamiento de animales

Las ratas (la mitad de las cuales era machos y la otra mitad era hembras) se dividieron aleatoriamente en dos grupos, es decir, un grupo de control en blanco de 10 animales y un grupo de modelización de 70 animales. Tras una modelización exitosa, las ratas se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos: un grupo de control modelo, un grupo positivo de fármaco (grupo de dexametasona) y los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 8, con 10 animales en cada grupo.

2.1.2 Establecimiento de modelos animales de asma alérgico en ratas

Igual que en Ejemplo 53.

2.1.3 Pauta posológica

La ingesta diaria del material compuesto de la Composición de fármaco 8 de ensayo en polvo recomendada para una persona era de 24 g de fármaco bruto/60 kg de peso corporal. Basándose en ella, la ingesta diaria calculada para una rata fue: grupo de dosis baja: 1,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis media: 2,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal; grupo de dosis alta: 6,0 g de fármaco bruto/kg de peso corporal, que eran 2,5, 5 y 15 veces la ingesta diaria para un ser humano, respectivamente. Las muestras se prepararon en soluciones intragástricas a las concentraciones correspondientes (7,26 mg de polvo seco/ml, 14,51 mg de polvo seco/ml, 43,54 mg de polvo seco/ml) para llevar a cabo los experimentos. El volumen de administración intragástrica se calculó como 1,0 ml/100 g de peso corporal. el grupo de control modelo recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica al 0,9 % 30 min antes de la exposición; y el grupo de fármaco positivo recibió dexametasona a una dosis de 0,5 mg/kg 30 min antes de cada desafío^[2]. Los grupos de baja, media y alta dosis de Composición 8 recibieron cada uno por vía intragástrica la dosis respectiva del fármaco de ensayo 30 min antes de cada exposición. Al mismo tiempo, el grupo de control en blanco recibió por inyección intraperitoneal, se expuso a la atomización con o recibió por vía intragástrica un volumen equivalente de solución salina fisiológica al 0,9 %. La administración intragástrica se llevó a cabo una vez al día durante 21 días consecutivos.

2.1.4 Registro del período latente del asma en ratas

Igual que en Ejemplo 53.

2.1.5 Mediciones de los niveles de IL-4 e IFN-γ

Igual que en Ejemplo 53.

2.1.6 Medición del contenido de EOS en los tejidos pulmonares

Igual que en Ejemplo 53.

2.2 Efecto sobre el asma alérgico en cobayas causado por un gas mixto de Ach e His

2.2.1. Igual que en 2.1.1.

2.2.2 Establecimiento de modelos animales de asma alérgico en cobayas

Igual que en Ejemplo 53.

2.2.3 Pauta posológica

Igual que en 2.1.3.

2.2.4 Registro del período latente del asma

Igual que en 2.1.4.1.

2.2.5 Medición de la IgE en suero y de BALF

Igual que en Ejemplo 53.

2.3 Método estadístico

Igual que en Ejemplo 53.

3. Resultados

3.1 Efecto de la Composición 8 sobre el asma alérgico en ratas causado por las OVA

3.1.1 Efecto sobre el período latente del asma inducido en ratas

5 Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se puntuaron los períodos latentes de asma inducido en ratas de cada grupo modelizado, sin una diferencia significativa entre ellos, lo que indica una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, los períodos latentes de asma inducido en las ratas del grupo de control positivo y los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo se prolongaron significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$).

Tabla 1. Efecto de la Composición 8 sobre el período latente del asma inducido en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación
Grupo de control en blanco	10	-	360	360
Grupo de control modelo	10	-	78,24 ± 13,92**	75,44 ± 12,76**
Grupo de control positivo	10	0,5 mg/kg	73,66 ± 11,19**	159,87 ± 20,38 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	76,63 ± 15,20**	85,13 ± 21,42
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	78,42 ± 14,17**	96,60 ± 20,75 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	78,49 ± 17,23**	106,54 ± 20,97 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.1.2 Efecto sobre los niveles de IL-4 e IFN- γ en ratas

15 Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 2. En comparación con el grupo de control en blanco, el grupo modelo mostró una significativa disminución del nivel de IFN- γ en suero ($p < 0,01$), pero un nivel significativamente aumentado de IL-4 en suero ($p < 0,01$), lo que indica un gran desequilibrio de la proporción de IFN- γ /IL-4 durante los ataques de asma. En comparación con el grupo modelo, el grupo de dexametasona y los grupos de dosis media y alta del fármaco de ensayo mostraron un nivel de IL-4 significativamente reducido ($p < 0,05$ o $p < 0,01$) y un nivel de IFN- γ significativamente mayor ($p < 0,05$ o $p < 0,01$), lo que indica que el fármaco de ensayo puede corregir la proporción desequilibrada de IFN- γ /IL-4.

Tabla 2. Efecto de la Composición 8 sobre los niveles de IL-4 e IFN- γ en ratas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	IL-4 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
Grupo de control en blanco	-	10	12,75 ± 2,63	24,41 ± 4,27
Grupo de control modelo	-	10	22,55 ± 3,68 ⁻⁻⁻	11,95 ± 3,36 ^{ΔΔ}
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	13,41 ± 4,21 ^{ΔΔ}	20,16 ± 4,96 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	20,67 ± 3,28	13,88 ± 3,87
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	18,35 ± 4,24 ^Δ	15,70 ± 3,92 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	16,22 ± 3,47 ^{ΔΔ}	17,46 ± 4,86 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.1.3 Efecto sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de rata

25 Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3. El número de EOS en ratas en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el grupo de control positivo y los grupos de dosis media y alta de fármaco de ensayo mostraron un número significativamente reducido de EOS ($p < 0,01$), lo que indica que la Composición 8 es eficaz en el tratamiento del asma alérgico, posiblemente al reducir el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de las ratas.

Tabla 3. Efecto de la Composición 8 sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de rata ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	EOS (células/HP)
Grupo de control en blanco	-	10	2,24 ± 0,85
Grupo de control modelo	-	10	103,60 ± 13,94**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	28,39 ± 4,26 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	93,21 ± 11,29
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	72,13 ± 10,34 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	65,22 ± 8,49 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2 Efecto de la Composición 8 sobre el asma alérgico en cobayas causado por un gas mixto de Ach e His

5 3.2.1 Efecto sobre el período latente del asma inducido en cobayas

Los resultados se muestran en la Tabla 4. Tras la modelización, se puntuaron los períodos latentes de asma inducido en cobayas de cada grupo modelizado, sin una diferencia significativa entre ellos, lo que indica una modelización exitosa. Tras la dosificación y el tratamiento, en comparación con el grupo de control modelo, los períodos latentes de asma inducido en las cobayas del grupo de control positivo y los grupos de dosis alta y media del fármaco de ensayo se prolongaron significativamente ($p < 0,05$ o $p < 0,01$), lo que indica que la Composición 8 aumenta enormemente los síntomas asmáticos en las cobayas.

Tabla 4. Efecto de la Composición 8 sobre el período latente del asma inducido en cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Número de animales	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Antes de la dosificación	Después de la dosificación
Grupo de control en blanco	10	-	360	360
Grupo de control modelo	10	-	77,18 ± 10,92**	78,00 ± 10,76**
Grupo de control positivo	10	0,5 mg/kg	74,63 ± 9,04**	156,77 ± 16,18 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	10	1,0	76,64 ± 14,20**	84,03 ± 21,42
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	10	2,0	77,92 ± 15,17**	97,40 ± 24,67 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	10	6,0	79,79 ± 19,23**	110,87 ± 24,53 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; ^Δ $p < 0,05$, ^{ΔΔ} $p < 0,01$ frente al grupo modelo.

15 3.2.2 Efecto sobre la IgE total en suero y sobre BALF de cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5. El contenido total de IgE en suero y de BALF en el grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el contenido total de IgE en suero y de BALF en el grupo de dexametasona y en los grupos en dosis media y alta del fármaco de ensayo disminuyeron significativamente ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), lo que indica que tanto la dexametasona como el fármaco de ensayo pueden inhibir la respuesta inflamatoria alérgica en el pulmón de cobaya y mejorar los síntomas asmáticos.

Tabla 5. Efecto de la Composición 8 sobre la IgE total en suero y sobre BALF de cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	Suero (U/l)	BALF (U/l)
Grupo de control en blanco	-	10	2,10 ± 0,87	3,69 ± 0,86
Grupo de control modelo	-	10	5,72 ± 1,47**	5,42 ± 1,34**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	3,65 ± 1,21 ^{ΔΔ}	3,62 ± 0,62 ^{ΔΔ}
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	5,21 ± 2,08	4,25 ± 1,67
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	4,35 ± 1,24 ^Δ	3,82 ± 1,55 ^Δ
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	3,98 ± 1,19 ^{ΔΔ}	3,79 ± 0,86 ^{ΔΔ}

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; $^{\Delta}p < 0,05$, $^{\Delta\Delta}p < 0,01$ frente al grupo modelo.

3.2.3 Efecto sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares cobayas

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 6. En comparación con el grupo de control en blanco, el nivel de recuento de EOS en las cobayas del grupo modelo aumentó significativamente ($p < 0,01$). En comparación con el grupo modelo, el nivel de recuento de EOS en el grupo de control positivo y los grupos de dosis media y alta de fármaco de ensayo se redujo significativamente ($p < 0,01$), lo que indica que la Composición 8 es eficaz en el tratamiento del asma alérgico, posiblemente al reducir el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de las cobayas.

Tabla 6. Efecto de la Composición 8 sobre el contenido de EOS en los tejidos pulmonares de cobayas ($\bar{x} \pm s$)

Grupos	Dosis (g de fármaco bruto/kg)	Número de animales	EOS (células/HP)
Grupo de control en blanco	-	10	5,26 \pm 2,85
Grupo de control modelo	-	10	94,60 \pm 14,98**
Grupo de control positivo	0,5 mg/kg	10	30,69 \pm 7,35 $^{\Delta\Delta}$
Grupo de dosis baja de fármaco de ensayo	1,0	10	82,38 \pm 12,29
Grupo de dosis media de fármaco de ensayo	2,0	10	67,35 \pm 12,05 $^{\Delta\Delta}$
Grupo de dosis alta de fármaco de ensayo	6,0	10	59,32 \pm 11,79 $^{\Delta\Delta}$

Nota: ** $p < 0,01$ frente al grupo en blanco; $^{\Delta\Delta}p < 0,01$ frente al grupo modelo.

4. Conclusiones

Los estudios experimentales con animales demuestran que la Composición 8 es capaz de mejorar significativamente los síntomas asmáticos en ratas y de prolongar el período de latencia del asma inducido en cobayas en los grupos modelo; de reducir el nivel de IL-4 en suero, de aumentar el nivel de IFN- γ en suero y corregir la proporción desequilibrada de IFN- γ /IL-4 en ratas con asma; de reducir el número de EOS en los tejidos pulmonares de las ratas y cobayas, y mejorar la infiltración de los EOS en las zonas inflamadas; de reducir el contenido total de IgE en suero y de BALF de las cobayas, y mejorar los síntomas inflamatorios pulmonares. Por lo tanto, la Composición 8 se considera eficaz en la resistencia al asma alérgico.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas, composición hecha de:

5 a) materias primas que comprenden:

- i) *Ganoderma*,
 ii) *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*,
 10 iii) *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*,
 iv) *Flos rosae rugosae* y,

opcionalmente, v) uno o más de entre esporas de *Ganoderma* en polvo, aceite de esporas de *Ganoderma*, *Radix pseudostellariae*, *Folium ginseng*, *Radix codonopsis* y *Radix astragali*; y

15 opcionalmente, b) agente/s auxiliar/es o excipiente/s que es/son aceptable/s en productos para el cuidado de la salud, medicamentos o productos.

2. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, composición que se puede obtener mezclando directamente las materias primas en partes en peso; o mezclando las materias primas en partes en peso y extrayéndolas con agua y/o alcohol, obteniéndose la composición; o extrayendo las materias primas con agua y/o alcohol y usando el extracto como principio activo para preparar la composición.

3. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, composición que consiste en:

25 a) materias primas:

- i) *Ganoderma*,
 ii) *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*,
 30 iii) *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o *Cordyceps*,
 iv) *Flos rosae rugosae* y,

opcionalmente, v) uno o más de entre esporas de *Ganoderma* en polvo, aceite de esporas de *Ganoderma*, *Radix pseudostellariae*, *Folium ginseng*, *Radix codonopsis* y *Radix astragali*; y

35 opcionalmente, b) agente/s auxiliar/es o excipiente/s que es/son aceptable/s en productos para el cuidado de la salud, medicamentos o productos.

4. La composición para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, **caracterizada por que** la composición está hecha de materias primas que comprenden de 5 a 200 partes en peso de *Ganoderma*, de 5 a 150 partes en peso de *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, de 1 a 90 partes en peso de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o de 1 a 120 partes en peso de *Cordyceps* y de 5 a 90 partes en peso de *Flos rosae rugosae*.

5. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizada por que** hay de 20 a 120 partes en peso de *Ganoderma*, de 10 a 90 partes en peso de *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, de 3 a 60 partes en peso de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o de 3 a 90 partes en peso de *Cordyceps* y de 10 a 60 partes en peso de *Flos rosae rugosae*, preferentemente, hay 40 partes en peso de *Ganoderma*, 30 partes en peso de *Radix panacis quinquefolii* o *Radix et rhizoma ginseng*, 20 partes en peso de *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado y/o 6,7 partes en peso de *Cordyceps* y 30 partes en peso de *Flos rosae rugosae*.

6. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-5, **caracterizada por que** la composición comprende uno o más de entre de 5 a 150 partes en peso de esporas de *Ganoderma* en polvo, de 1 a 90 partes en peso de aceite de esporas de *Ganoderma*, de 10 a 400 partes en peso de *Radix pseudostellariae*, de 1 a 120 partes en peso de *Folium ginseng*, de 3 a 400 partes en peso de *Radix codonopsis* y de 3 a 400 partes en peso de *Radix astragali*, o cualquiera de sus combinaciones.

7. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada por que** hay uno o más de entre de 10 a 120 partes en peso de esporas de *Ganoderma* en polvo, de 10 a 60 partes en peso de aceite de esporas de *Ganoderma*, de 20 a 200 partes en peso de *Radix pseudostellariae*, de 20 a 90 partes en peso de *Folium ginseng*, de 20 a 200 partes en peso de *Radix codonopsis* y de 20 a 200 partes en peso de *Radix astragali*, o cualquiera de sus combinaciones, en la composición.

8. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada por que** hay uno o más de entre 30 partes en peso de esporas de *Ganoderma* en polvo, 20 partes en peso de aceite de esporas de *Ganoderma*, 40 partes en peso de *Radix pseudostellariae*, 30 partes en peso de *Folium ginseng*, 40 partes en peso de *Radix codonopsis* y 40 partes en peso de *Radix astragali*, o cualquiera de sus combinaciones, en la composición.

65

9. La composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, **caracterizada por que** las enfermedades alérgicas son rinitis alérgica, dermatitis alérgica, asma alérgico y/o urticaria.
- 5 10. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, **caracterizada por que** la especie a la que pertenece el *Cordyceps sinensis* en polvo fermentado es una de o cualquier combinación de: *Paecilomyces hepialli* Chen y Dai, sp. nov, *Mortierella hepialid* C. T. y B. liu, *Synnematium sinensis* Yin y Shen, *Gliocladium roseum* (link) Thom, *Mortierella* sp., *Cephalosporium sinensis* Chen sp. nov o *Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu y Zeng, sp. nov.
- 10 11. La composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, **caracterizada por que** las esporas de *Ganoderma* en polvo son esporas de *Ganoderma* en polvo con el esporodermo roto.