

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 249**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/71** (2006.01)

**A61K 36/185** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61Q 19/00** (2006.01)

**A61K 8/97** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2012 E 16176916 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3097920**

54 Título: **Composición química que comprende extracto de Stauntonia Hexaphylla**

30 Prioridad:

**18.08.2011 KR 20110082023**

**16.04.2012 KR 20120038977**

**11.05.2012 KR 20120050532**

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

**03.04.2020**

73 Titular/es:

**JEONNAM BIOINDUSTRY FOUNDATION (50.0%)**

**30-5 Dongsunonggongdanji-gil, Naju-si**

**Jeollanam-do 520-330, KR y**

**YUNGJIN PHARMACEUTICAL CO., LTD (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHOI, CHUL YUNG;**

**PAN, SANG O;**

**SEOL, HEE JIN;**

**LEE, GYU OK;**

**PARK, KA HYON;**

**KIM, HEE SOOK;**

**JANG, WOOK JIN;**

**KIM, HYUN;**

**LEE, DONG WOOK;**

**KIM, SUN OH y**

**KIM, JAE GAP**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 752 249 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 química que comprende extracto de *Stauntonia Hexaphylla*

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La presente invención se relaciona con una composición que comprende un extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* y uso del extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*.

Descripción de la técnica relacionada

- 10 Una respuesta inflamatoria es una respuesta inmune que ocurre localmente, cuando las células o tejidos son dañados o rotos debido a diferentes causas, por ejemplo, exposición a sustancias dañinas o sistemas orgánicos que incluyen agentes de infección externa tales como bacterias, hongos, virus o una variedad de alérgenos, de manera que si minimiza el daño y se restablecen los sitios dañados a un estado original.

- 15 Adicionalmente, diferentes causas que inducen inflamación incluyen causas físicas tales como trauma, quemaduras, congelación y radioactividad, causas químicas tales como sustancias químicas, por ejemplo ácidos, y causas inmunológicas tales como respuesta a anticuerpos. Adicionalmente, la inflamación puede ser causada por desequilibrio de vasos u hormonas.

- 20 La respuesta inflamatoria es un mecanismo de defensa que es útil para proteger sistemas biológicos y eliminar sustancias producidas por daño de tejido, e implican síntomas que incluyen activación enzimática causada por mediadores de inflamación e inmunocitos presentes en vasos locales o fluidos corporales, secreción de mediadores de inflamación, infiltración de fluidos corporales, migración celular, destrucción de tejido, eritema, edema, fiebre, dolor o similares. Tales síntomas pueden causar disfunción.

- 25 En un caso normal, la inflamación funciona para eliminar agentes de infección externa o neutralizar o eliminar factores de enfermedad, y para regenerar tejidos dañados y por lo tanto para restablecer estructuras normales y funciones a través de una respuesta inflamatoria *in vivo*. Sin embargo, como los antígenos no son retirados continuamente o la inflamación se vuelve serie sobre un nivel predeterminado o crónico debido a sustancias endógenas específicas, las enfermedades tales como hipersensibilidad o inflamación crónica pueden propagarse desventajosamente. La respuesta inflamatoria se encuentra en la mayoría de enfermedades clínicas y se conocen las enzimas implicadas en la respuesta inflamatoria por jugar un papel importante en la carcinogénesis. Adicionalmente, la inflamación es un obstáculo en el curso del tratamiento, como transfusión de sangre, medicación o trasplante de órganos.

- 30 Se implica una respuesta inflamatoria en diferentes eventos bioquímicos. En particular, la respuesta inflamatoria se inicia o controla por enzimas asociadas a la respuesta inflamatoria producidas por inmunocitos.

- 35 Como se ha revelado recientemente, la progresión en la respuesta inflamatoria *in vivo* se conoce por estar implicada en actividades enzimáticas de ciclooxigenasa (COX). La enzima de COX es una enzima principal implicada en la biosíntesis de la prostaglandina presente en sistemas biológicos. Dos iso-enzimas, es decir, COX-1 y COX-2, son conocidas. La COX-1 existe en tejidos tales como estómago o riñón y es responsable del mantenimiento de la homeostasis normal. Por otra parte, COX-2 es temporalmente y rápidamente expresada en células por mitógenos o citoquinas sobre inflamación u otras respuestas inmunes.

- 40 Otro mediador de inflamación potente, óxido nítrico (NO), se sintetiza partir de L-arginina a través de sintetasa de NO (NOS) y se producen diferentes tipos de células en respuesta a tensión exterior tal como luz UV light, o sustancias tales como endotoxinas o citoquinas. Dichos estímulos inflamatorios aumentan la expresión de NOS inducible (iNOS) en células e inducen la producción de NO en células a través de iNOS, que activan de esta forma macrófagos celulares y que resultan en respuesta inflamatoria.

- 45 Por consiguiente, la investigación asociada con sustancias que inhiben la producción de NO está recientemente en curso para el alivio eficiente de la inflamación. Sin embargo, las sustancias antiinflamatorias desarrolladas a través de tales investigaciones tienen varios efectos secundarios. Por ejemplo, se conocen fármacos anti-inflamatorios no esteroideos usados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas o enfermedades inflamatorias crónicas por inhibir tanto enzimas de COX-2 como enzimas de COX-1 y de esta forma causan efectos secundarios tales como trastornos gastrointestinales.

- 50 Mientras tanto, los cosméticos son usados rutinariamente para proteger la piel y realizar funciones de embellecimiento y limpieza. Sin embargo, las composiciones cosméticas usan ingredientes indispensables para la formación de productos cosméticos que son inconsistentes con aplicación de protección de la piel. Por ejemplo, los siguientes incluyen tensioactivos, conservantes, aromatizantes, bloqueadores de UV, pigmentos y diversos ingredientes para impartir otras eficacias y efectos. Los ingredientes usados necesariamente para la producción de cosméticos son conocidos por causar efectos secundarios, tales como inflamación, granos o edema, a la piel.

Adicionalmente, se descompone el suero y sudor secretado por el cuerpo, y ácidos grasos, alcoholes superiores y proteínas como componentes cosméticos en sustancias altamente tóxicas por flora residente presente en la piel, que induce de esta forma inflamación de la piel. Es bien conocido que la luz UV emitida por el sol también puede inducir a la inflamación de la piel.

5 Como tal, los factores que causan efectos secundarios en la piel son siempre potenciales en cosméticos y se ha realizado una variedad de investigaciones para resolver estos factores. Las sustancias usadas a la fecha para aliviar la irritación tal como eritema o edema e inflamación incluyen sustancias no esteroideas tales como ácido flufenámico, ibuprofeno, benzidamina e indometacina, sustancias esteroideas tales como prednisolona y dexametasona. Son conocidos alantoína, azuleno, ácido  $\epsilon$ -aminocaproico, hidrocortisona, ácido de regaliz y derivados de los mismos (ácido  $\beta$ -glicirricínico, derivados del ácido glicirricínico) por ser efectivos en la antiinflamación.

10 Sin embargo, indometacina, generalmente usada como un agente antiinflamatorio, es inadecuada para el uso en cosméticos, la hidrocortisona tiene una dosificación limitada, el ácido de regaliz y derivados de los mismos no proporcionan efectos sustanciales debido a la concentración limitada en la aplicación práctica causada por la dificultad en la estabilización o solubilidad pobre. El uso de la mayoría de agentes antiinflamatorios conocidos a la fecha está limitado a problemas en términos de seguridad de la piel o estabilidad en la mezcla.

15 Adicionalmente, los mecanismos de agentes terapéuticos asociados con gastritis son asociados primariamente con bloqueadores de H2 que bloquean el segundo receptor de histamina (receptor de H2) para reducir la secreción de ácido gástrico de células parietales. El ácido gástrico reducido previene daño adicional de células parietales dañadas (tales como úlceras gástricas). Dichos bloqueadores de H2 perturban los metabolismos de otros fármacos, es decir, inhibidores potentes de P-450 en el hígado, y de esta forma requieren atención cuando se administran en combinación con otros fármacos. Los bloqueadores de H2 pueden causar efectos secundarios tales como ginecomastia, impotencia y trastorno del deseo sexual hipoactivo, pueden ocurrir en los hombres debido a que exhiben efectos antiandrogénicos. Adicionalmente, los bloqueadores de H2 pasan a través de las barreras de placenta y cerebrovasculares, que causan de esta forma más efectos secundarios dañinos a mujeres embarazadas o a los ancianos, y que resultan en dolor de cabeza, confusión, estupor o mareos.

20 Por consiguiente, existe una necesidad de sustancias que son derivadas de sustancias naturales, eficientemente inhiben la producción de NO, inhiben la expresión de iNOS y TNF- $\alpha$ , eficientemente inhiben actividades de enzimas de COX-2, exhiben excelentes efectos antiinflamatorios, tienen pocos o ningún efecto secundario o citotoxicidad y de esta forma no tienen casi límite en términos de contenido porque son derivados de sustancias naturales.

30 En particular, en la actualidad, están activamente en marcha las investigaciones y desarrollos asociados con fármacos antiinflamatorios como medicinas naturales que usan ingredientes naturales, o cosméticos o componentes de cosméticos que usan ingredientes naturales con el fin de satisfacer la demanda del consumidor.

35 Adicionalmente, un fármaco antipirético es una medicina que actúa para disminuir la fiebre, elevar la temperatura del cuerpo, y también se indica como un fármaco antipirético y analgésico porque generalmente actúa para aliviar tanto la fiebre como el dolor.

La hipótesis actualmente creída con respecto al mecanismo de acción asociado con el fármaco antipirético es que el fármaco antipirético inhibe la biosíntesis de prostaglandina (PG) y por lo tanto alivia la fiebre y realiza acción antipirética.

40 Específicamente, en caso de fiebre, los niveles de prostaglandina aumentan en centros termorregulatorios del hipotálamo. Por esta razón, se inhibe la actividad febril y el efecto antipirético se obtiene así mediante la reducción de los niveles de prostaglandina en los centros termo regulatorios. Adicionalmente, la prostaglandina es un mediador conocido que induce dolor. Sin embargo, se ha sugerido una variedad de mecanismos asociados con síntomas febriles.

45 Actualmente los medicamentos antipiréticos prescritos incluyen derivados de ácido salicílico tales como aspirina, derivados de anilina tales como acetanilida y fenacetina, y derivados de pirazolona tales como antipirina, aminopirina o sulpirina. Adicionalmente, entre los fármacos antiinflamatorios, hay fármacos antiinflamatorios no esteroideos que tienen acciones antipiréticas y analgésicas tales como indometacina.

50 Como se describió anteriormente, se encuentra a menudo la correlación entre las acciones antipiréticas y analgésicas y los efectos antiinflamatorios, es decir, efectos que alivian la inflamación. Sin embargo, algunos fármacos no tienen casi acción antiinflamatoria, pero tienen acción antipirética potente, mientras otros medicamentos no tienen casi acción antipirética, pero tienen efectos antiinflamatorios potentes. Por lo tanto, se determina el efecto antiinflamatorio para no estar necesariamente de manera directa relacionado con efectos antipiréticos y analgésicos.

55 Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar sustancias que son derivadas de sustancias naturales, no químicas que causan problemas implicadas en diferentes efectos secundarios, tal como agentes de anilina que causan intoxicación aguda, exhiben acción antipirética superior y casi no tienen riesgo de los efectos secundarios o citotoxicidad porque son derivados de sustancias naturales.

En particular, en la actualidad, están activamente en marcha las investigaciones y desarrollos asociados con medicamentos antiinflamatorios como medicinas naturales que usan ingredientes naturales con el fin de satisfacer la demanda del consumidor.

Resumen de la invención

5 Por lo tanto, la presente invención se ha realizado en vista de los problemas anteriores, y es un objeto de la presente invención proporcionar una composición antiinflamatoria, como un ingrediente activo, que contiene un extracto de planta que tiene una baja probabilidad de ocurrencia de problemas asociados con efectos secundarios.

10 Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición antipirética que contiene, como un ingrediente activo, un extracto de planta que tiene una probabilidad baja de ocurrencia de problemas asociados con efectos secundarios.

15 De acuerdo con la presente invención, se puede lograr el anterior y otros objetivos mediante la proporción de una composición antiinflamatoria que comprenden extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* como un ingrediente activo. La composición antiinflamatoria puede ser una composición médica, por ejemplo, un fármaco antipirético y analgésico. Adicionalmente, se puede proporcionar la composición antiinflamatoria como un ingrediente activo de una composición cosmética para inhibir la inflamación.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un fármaco antiinflamatorio que comprende un extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* como un ingrediente activo.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición cosmética para aliviar o que alivia la inflamación, que comprenden extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* como un ingrediente activo.

20 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición antipirética que comprende extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* como un ingrediente activo. La composición antipirética puede ser una composición médica, por ejemplo, un fármaco antipirético o un fármaco antipirético y analgésico.

25 Durante la investigación asociada con la antiinflamación de origen natural, los inventores de la presente invención encontraron que un extracto de *Stauntonia Hexaphylla* exhibe efectos antiinflamatorios superiores. Más específicamente, el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* inhibe eficientemente la secreción de NO, suprime la expresión de iNOS relacionado con la producción de NO, e inhibe actividades de enzimas de ciclooxigenasa (COX) que progresan la respuesta inflamatoria asociada con la biosíntesis de prostaglandina presente en el cuerpo. Adicionalmente, se ha encontrado que, entre diferentes fracciones de solvente de los extractos de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*, una fracción de acetato de etilo inhibe eficientemente tanto la producción de NO como la actividad enzimática de COX, como se comparó con otras fracciones de solvente, siempre y cuando no se generen problemas asociados con la toxicidad.

30 Adicionalmente, durante la investigación asociada con agentes antiinflamatorios derivados de sustancias naturales, los inventores de la presente invención encontraron que un extracto de *Stauntonia Hexaphylla* exhibe efectos antipiréticos superiores. Más específicamente, se encuentra que el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* tiene efectos antipiréticos superiores notablemente, mientras otros extractos de planta que tienen efectos antiinflamatorios no tienen o casi no tienen efectos antipiréticos. Adicionalmente, se ha encontrado que, entre diferentes fracciones de solvente de extractos de *Stauntonia Hexaphylla*, una fracción de acetato de etilo exhibe efectos antipiréticos superiores, en comparación con otras fracciones, siempre y cuando no se generen problemas asociados con toxicidad.

A continuación, se describirá la presente invención en más detalle.

40 La presente invención está dirigida a una composición antiinflamatoria que comprende un extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* como un ingrediente activo.

La *Stauntonia Hexaphylla* es una planta perenne trepadora de ranales Lardizabalaceae dicotiledóneas, que también es llamada "árbol de *Stauntonia Hexaphylla*".

45 La *Stauntonia Hexaphylla* es un monoico. Las hojas de *Stauntonia Hexaphylla* son alternas de filotaxis y hojas compuestas palmeadamente compuestas de cinco a siete pequeños folíolos. Las flores de *Stauntonia Hexaphylla* florecen en mayo, son de color blanco amarillento y tienen inflorescencia racemosa. Los frutos de *Stauntonia Hexaphylla* son bayas ovaladas u ovals y tienen una longitud de 5 cm a 10 cm, maduran a pardo rojizo en octubre, y su pulpa es más deliciosa que las bayas clemátides. Las semillas de *Stauntonia Hexaphylla* tienen una forma oval similar al huevo y son de color negro. La *Stauntonia Hexaphylla* se encuentra predominantemente en Corea, Japón, Taiwán o China. La *Stauntonia Hexaphylla* se cultiva principalmente en los valles y bosques en las regiones del sur como Jeollanam-do, Gyeongsangnam-do y Chungcheongnamdo en Corea.

50 El extracto de *Stauntonia Hexaphylla* se puede producir de acuerdo con un método de producción común de extractos de planta. Por ejemplo, el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* se produce mediante la extracción frutos, flores, hojas, ramas, tallos, raíces, cáscaras de *Stauntonia Hexaphylla*, o granos obtenidos triturando estas sustancias (a

- continuación, simplemente indicados como "granos"), preferiblemente hojas de *Stauntonia Hexaphylla* o frutos de *Stauntonia Hexaphylla*, más preferiblemente hojas de *Stauntonia Hexaphylla*, con un solvente de extracción, o extrayendo lo mismo con un solvente de extracción y después fraccionando los extractos crudos resultantes con un solvente de fraccionamiento. Las hojas de *Stauntonia Hexaphylla* se cultivan en una gran cantidad en comparación con otros sitios de los mismos, son de esta manera fáciles de producir y exhiben efectos antiinflamatorios superiores. Por consiguiente, el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* es un extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*.
- El solvente de extracción puede comprender al menos uno seleccionado del grupo que consiste en agua y solventes orgánicos. El solvente orgánico puede ser un solvente polar tal como alcohol que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, alcohol diluido, acetato de etilo o acetona, un solvente no polar tal como éter, cloroformo, benceno, hexano o diclorometano, o una mezcla de los mismos. El alcohol que tiene de 1 a 5 átomos de carbono puede ser metanol, etanol, propanol, butanol, isopropanol o similares, pero la presente invención no se limita a los mismos. Además, el alcohol diluido se puede obtener diluyendo alcohol con agua a una concentración del 50% (v/v) al 99.9% (v/v).
- El solvente de extracción del extracto de *Stauntonia Hexaphylla* comprende preferiblemente al menos uno seleccionado del grupo que consiste en agua, alcoholes que tienen 1 a 5 átomos de carbono, alcohol diluido y mezclas de los mismos, más preferiblemente comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en agua, alcoholes que tienen de 1 a 4 átomos de carbono y una mezcla de los mismos, e incluso más preferiblemente comprende agua.
- La extracción se puede llevar a cabo de 50°C a 150°C, o 75°C a 130°C, o 90°C a 120°C, pero la presente invención no está limitada a los mismos. Adicionalmente, el tiempo de extracción no está limitado particularmente, pero puede ser 10 minutos a 12 horas, o 30 minutos a 6 horas, o 2 horas a 4 horas.
- Se puede producir el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* de acuerdo con la presente invención de acuerdo con un método general de producción de extractos de plantas. Específicamente, el método puede ser extracción en caliente incluyendo agua caliente, extracción por inmersión en frío, extracción por inmersión en caliente, extracción ultrasónica o similar y se puede llevar a cabo usando un extractor ordinario, extractor ultrasónico o fraccionador.
- Adicionalmente, el extracto extraído con un solvente puede ser entonces sometido a fraccionamiento usando al menos un solvente seleccionado del grupo que consiste en hexano, cloroformo, acetato de etilo cloruro de metileno, éter etílico, acetona, butanol, agua y mezclas de los mismos. El solvente usado para fraccionamiento puede ser una combinación de dos o más tipos y puede ser usado secuencialmente o en combinación de acuerdo con la polaridad del solvente para preparar extractos del solvente respectivos.
- Una fracción del extracto de *Stauntonia Hexaphylla* es preferiblemente una fracción de acetato de etilo o una fracción de cloroformo, más preferiblemente una fracción de acetato de etilo.
- El extracto preparado o la fracción obtenida por el procedimiento de fraccionamiento pueden después ser sometidos a filtración, concentración y/o secado para eliminar el solvente. Específicamente, se puede llevar a cabo la filtración usando un papel de filtro o filtro de vacío, se puede llevar a cabo la concentración por concentración en vacío usando un concentrador de vacío, por ejemplo, un evaporador giratorio, y el secado puede por ejemplo ser por liofilización.
- El extracto de *Stauntonia Hexaphylla*, por ejemplo un extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* o extracto en agua caliente de un fruto de *Stauntonia Hexaphylla*, se ha encontrado que no tiene citotoxicidad incluso cuando se trata a una concentración de 200 µg/ml como un resultado del análisis de MTT.
- Por consiguiente, se puede usar la composición antiinflamatoria para inhibir la inflamación, o para tratar, disminuir, aliviar o prevenir la inflamación.
- La inflamación incluye enfermedades inflamatorias generales y las enfermedades inflamatorias por ejemplo incluyen uno o más seleccionados del grupo que consiste en diferentes enfermedades inflamatorias crónicas, tales como diversas dermatitis que incluyen dermatitis, dermatitis atópica, dermatomiositis, polimiositis, alergias, lupus eritematoso sistémico, pénfigo, estomatitis aftosa, retinitis, gastritis, hepatitis, bronquitis, esofaguitis, colitis, pancreatitis, colitis, nefritis, decúbito, lupus, tiroiditis crónica y esclerosis múltiple, diferentes enfermedades inflamatorias agudas tales como sepsis, choque, lesión por radiación y rechazo de trasplante de órganos, edema generalizado y edema localizado.
- Por consiguiente, la composición antiinflamatoria puede ser usada para tratar, prevenir o aliviar enfermedades inflamatorias.
- Las alergias incluyen anafilaxia, rinitis alérgica, asma, conjuntivitis alérgica, dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticaria, alergias a los insectos, alergias a los alimentos y alergias a los medicamentos.
- El edema generalizado puede ser específicamente seleccionado del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca congestiva, pericarditis constrictiva, cardiomiopatía restrictiva, cirrosis hepática, insuficiencia renal, síndrome nefrótico y una combinación de los mismos. El edema localizado es un hinchamiento de una porción de piel y tejidos blandos, y específicamente incluye celulitis acompañada con inflamación de la piel y tejidos blandos, trastorno del drenaje de

las venas o vasos linfáticos, quemaduras acompañadas con pérdida parcial de la piel y tejidos blandos, mordeduras de insectos, e infección bacteriana.

5 Por consiguiente, la composición antiinflamatoria de la presente invención puede ser aplicada como una composición para el tratamiento o prevención de enfermedades inflamatorias, o composición de alimentos para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias. La composición de alimentos es por ejemplo una composición de elementos funcionales de salud para prevenir o aliviar enfermedades inflamatorias.

10 El alimento de función de salud indica un grupo de alimentos que tienen valores añadidos proporcionados por métodos físicos, bioquímicos y biotecnológicos de manera que el alimento correspondiente realiza o ejerce las funciones deseadas adecuadas para aplicaciones específicas, un alimento procesado que es diseñado de manera que una composición del alimentos exhibe suficientemente las funciones de modulación del cuerpo deseadas tales como control de ritmo de defensa biológica, y prevención de enfermedades y restauración.

El alimento de función de salud puede comprender un aditivo auxiliar de alimentos aceptables citológicamente, y puede incluir adicionalmente un vehículo adecuado, excipiente y diluyente comúnmente usado para la preparación de alimentos funcionales de salud.

15 La composición de alimento funcional de salud para prevenir o aliviar enfermedades inflamatorias de acuerdo con la presente invención puede comprender el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* en una cantidad de 0.001% en peso a 99.9% en peso o 0.01% en peso a 50% en peso o 0.1% en peso a 30% en peso o 0.1% en peso a 15% en peso, con base en el peso total del alimento.

20 La composición antiinflamatoria puede ser usada como un ingrediente del medicamento o para aplicaciones médicas o farmacéuticas. Con este respecto, la composición de antiinflamación puede ser una composición química, por ejemplo, un fármaco antipirético y analgésico.

25 La composición antiinflamatoria que comprende el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* como un ingrediente activo se puede aplicar directamente a animales que incluyen humanos. Los animales son una familia de organismos, en contraste con plantas, que absorben principalmente material orgánico como nutrientes y son diferenciados en órganos digestivos, escriptorios y respiratorios, y son preferiblemente mamíferos, más preferiblemente humanos.

30 El extracto de *Stauntonia Hexaphylla* se puede usar sólo en la composición antiinflamatoria y puede comprender adicionalmente un vehículo, excipiente, diluyente o adyuvante aceptable farmacéuticamente. Más específicamente, cuando la composición que comprende el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* se puede usar como un ingrediente del medicamento o para aplicaciones médicas o farmacéuticas, se puede mezclar el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* con un vehículo o excipiente aceptable farmacéuticamente o ser diluido con un agente de dilución de acuerdo con un método general anteriormente usado.

35 En este caso, un contenido del extracto de *Stauntonia Hexaphylla* en la composición puede ser 0.001% en peso a 99.9% en peso, 0.1% en peso a 99% en peso o 1% en peso a 50% en peso, pero en la presente invención no está limitada a ello. El contenido del extracto puede ser controlado a un nivel razonable de acuerdo con la forma de uso y método de la composición.

40 Los ejemplos del vehículo, excipiente o diluyente aceptable farmacéuticamente incluyen, pero no están limitados a, uno o más seleccionados del grupo que consiste en lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato cálcico, silicato cálcico, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, aceite mineral, dextrina, carbonato de calcio, propilenglicol, parafina líquida y solución salina fisiológica, pero cualquier vehículo, excipiente o diluyente ordinario puede usarse sin limitación para estas sustancias. Además, la composición farmacéutica puede comprender además relleno ordinarios, extendedores, aglutinantes, agentes desintegrantes, agentes antiaglutinantes, agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes de control del pH, nutrientes, vitaminas, electrolitos, ácido alginico y sales de los mismos, ácido péctico y sales de los mismos, coloides protectores, glicerina, agentes aromatizantes, emulsionantes o conservantes. Estos ingredientes pueden añadirse individualmente o en combinación al extracto de *Stauntonia Hexaphylla*, el ingrediente activo.

Adicionalmente, la composición de la presente invención puede comprender además, en adición al ingrediente activo, sustancias bien conocidas determinadas por tener efectos antiinflamatorios, por ejemplo, sustancias usadas como inhibidores de COX-2, inhibidores de NO o medicamentos antiinflamatorios.

50 Se puede administrar la composición oralmente o parenteralmente cuando se usa como un ingrediente del medicamento la composición puede, por ejemplo, administrarse a través de diferentes rutas que incluyen rutas orales transdérmicas, subcutáneas, intravenosas y musculares.

55 Adicionalmente, se puede variar una formulación de la composición de acuerdo con la forma de uso y se puede formular la composición por un método bien conocido en la técnica de manera que el ingrediente activo es liberado rápidamente, sostenido o retrasado después de la administración a un animal mamífero. Generalmente, las preparaciones sólidas para administración oral incluyen comprimidos, tabletas, cápsulas blandas o duras, pastillas,

- 5 polvos, gránulos y similares. Estas preparaciones pueden, por ejemplo, prepararse mediante la preparación de uno o más excipientes, tales como almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa y gelatina. Adicionalmente, además de un excipiente simple, se pueden usar lubricantes tales como estearato de magnesio o talco. Las preparaciones líquidas para administración oral incluyen suspensiones, líquidos y soluciones para uso interno, emulsiones, jarabes y similares. Las preparaciones líquidas pueden comprender varios excipientes, por ejemplo, agentes humectantes, agentes dulcificantes, agentes saborizantes y conservantes, además de agua y parafina líquida, que son comúnmente usados como diluentes simples.
- Las preparaciones para administración parenteral incluyen cremas, lociones, ungüentos, yesos, líquidos y soluciones, aerosoles, extractos fluidos, elixires, infusiones, bolsitas, parches, inyecciones y similares.
- 10 Adicionalmente, se pueden formular la composición de la presente invención usando un método razonable bien conocido en la técnica al cual la presente invención pertenece o un método descrito en Remington's Pharmaceutical Science (edición reciente, Mack Publishing Company, Easton PA).
- Se puede determinar la dosificación de la composición en consideración del método de dosificación, edad y sexo de los tomadores, gravedad y condiciones de los pacientes, ingesta de ingrediente activo en el cuerpo, proporción de inactivación y fármacos usados conjuntamente con ellos. La dosificación puede ser por ejemplo 0.1 mg/kg (peso corporal) a 500 mg/kg (peso corporal), 0.1 mg/kg (peso corporal) a 400 mg/kg (peso corporal) o 1 mg/kg (peso corporal) a 300 mg/kg (peso corporal), con base en el ingrediente activo por día. Se puede administrar la composición una vez o en varias porciones. La dosificación no se construye como limitante del alcance de la presente invención en ningún aspecto.
- 15 Adicionalmente, la presente invención proporciona una composición antiinflamatoria que comprende el extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* como un ingrediente activo.
- Adicionalmente, la presente invención proporciona un fármaco antiinflamatorio que comprende el extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* como un ingrediente activo.
- 25 El extracto de *Stauntonia Hexaphylla* es preferiblemente un extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*, más preferiblemente una fracción de acetato de etilo de un extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*.
- El fármaco antiinflamatorio puede comprender el ingrediente activo sólo y puede comprender adicionalmente un vehículo o excipiente aceptable farmacéuticamente de acuerdo con la formulación, la forma de uso y propósito de uso. Cuando se proporciona el fármaco antiinflamatorio como una mezcla, el ingrediente activo puede estar presente en una cantidad de 0.1% en peso to 99.9% en peso, con respecto al peso total del fármaco antiinflamatorio, pero generalmente está presente en una cantidad de 0.001% en peso a 50% en peso.
- 30 Se puede usar el fármaco antiinflamatorio para prevenir y tratar diferentes enfermedades inflamatorias crónicas tales como lupus y esclerosis múltiple, diversas enfermedades inflamatorias agudas tales como sepsis, choque, lesión por radiación y rechazo de trasplante de órganos, enfermedades oftalmológicas, bronquitis o enfermedades inflamatorias intestinales.
- 35 Los ejemplos del vehículo o excipiente incluyen, pero no están limitados a, agua, dextrina, carbonato de calcio, lactosa, propilenglicol, parafina líquida, solución salina fisiológica, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, gelatina, fosfato de calcio, silicato cálcico, celulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. El vehículo o excipiente se puede usar en combinación de dos o más tipos.
- 40 Adicionalmente, cuando se proporciona el fármaco antiinflamatorio como una medicina, la medicina puede comprender ordinariamente rellenos, extendedores, aglutinantes, agentes de desintegración, tensioactivos, agentes antiaglutinantes, agentes lubricantes, humectantes, saborizantes, emulsionantes, conservantes o similares.
- 45 Adicionalmente, el fármaco antiinflamatorio de la presente invención puede comprender además, adicionalmente el ingrediente activo, un compuesto bien conocido o extracto de planta que tiene actividad antiinflamatorio, y el compuesto o extracto de planta puede estar presente en una cantidad de 0.1 partes en peso a 99.9 partes en peso o 0.5 partes en peso a 20 partes en peso con respecto a 100 partes en peso del ingrediente activo.
- Se pueden formular el fármaco antiinflamatorio en una forma adecuada determinada acuerdo con la forma de uso y en particular, se puede formular por un método bien conocido en la técnica de manera que el ingrediente activo es liberado rápidamente, sostenido o retrasado después de la administración a un animal mamífero. específicamente, los ejemplos de la formulación incluyen yesos, gránulos, lociones, linimentos, limonajes, polvos, jarabes, ungüentos oculares, líquidos y soluciones, aerosoles, extractos, elixires, ungüentos, extractos de fluido, emulsiones, suspensiones, decocciones, infusiones, gotas para los ojos, tabletas, supositorios, inyecciones, bebidas espirituosas, cápsulas, cremas, pastillas, cápsulas de gelatina blanda o dura y similares.
- 50

- El fármaco antiinflamatorio de acuerdo con la presente invención se puede administrar oral o parenteralmente y puede, por ejemplo, usarse a través de rutas dérmicas, intramusculares, intraperitoneales, intravenosas, subcutáneas, nasales, epidurales y orales. Se puede determinar la dosificación en consideración del método de dosificación, edad, sexo y peso corporal de los tomadores, severidad de las enfermedades y similares. Por ejemplo, se puede administrar el fármaco antiinflamatorio de la presente invención una o más veces en una dosificación diaria de 0.1 mg/kg (peso corporal) a 100 mg/kg (peso corporal), con base en el ingrediente activo. Sin embargo, se proporciona la dosificación únicamente como un ejemplo y la presente invención no está limitada a la misma.
- Adicionalmente, la presente invención proporciona una composición cosmética que comprende el extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* como un ingrediente activo.
- El extracto de *Stauntonia Hexaphylla* es libre de ambos problemas asociados con efectos secundarios porque es derivado de una sustancia natural, no tiene citotoxicidad, y regula eficientemente la inflamación inducida por ingredientes contenidos en cosméticos e inflamación inducida por ambientes externos debido al potente efecto inhibitorio de inflamación y así actividades antiinflamatorias y antiirritantes superiores. Por consiguiente, se puede usar el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* como un ingrediente activo de la composición cosmética que tiene los efectos de disminuir, prevenir y aliviar la inflamación. A este respecto, la composición cosmética puede ser una composición cosmética para disminuir o aliviar la inflamación.
- El extracto de *Stauntonia Hexaphylla* es preferiblemente un extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*, más preferiblemente una fracción de acetato de etilo de un extracto en agua caliente de *Stauntonia Hexaphylla*.
- Se puede usar la composición cosmética en aplicaciones que incluyen cosméticos para el cuidado de la piel, cosméticos para maquillaje, cosméticos para el cuerpo, cosméticos para el cabello, cosméticos para el cuero cabelludo, cosméticos para el afeitado o cosméticos orales.
- Los ejemplos de cosméticos para el cuidado de la piel incluyen cremas, lociones, empaques, cremas de masaje, emulsiones y similares, ejemplos de los cosméticos para maquillaje incluyen fundaciones, bases de maquillaje, barras de labios, sombras de ojos, lápices de labios, máscaras, lápices de cejas y similares, y ejemplos de cosméticos para el cuerpo incluyen jabones, detergentes líquidos, preparaciones de baño, cremas de protección solar, aceites de protección solar y similares. Los ejemplos de cosméticos para el cabello incluyen champús para el cabello, acondicionadores, tratamientos para el cabello, mousse para el cabello, líquidos para el cabello, pomadas, colores para el cabello, blanqueadores para el cabello, enjuagues de color y similares, y ejemplos de cosméticos para el cuero cabelludo incluyen tónicos para el cabello, tratamientos del cuero cabelludo o similares. Ejemplos de los cosméticos para el afeitado incluyen lociones después del afeitado o cremas de afeitar y ejemplos de los cosméticos orales incluyen pasta dentífrica, lavados bucales y similares.
- Adicionalmente al ingrediente activo, los ingredientes comúnmente mezclados con composiciones cosméticas, por ejemplo, humectantes, absorbentes de rayos UV, vitaminas, extractos de animales y plantas, digestores, agentes blanqueadores, vasodilatadores, astringentes, agentes refrescantes y medicamentos hormonales, se pueden mezclar adicionalmente con la composición cosmética, de acuerdo al uso deseado y propiedades de la composición cosmética. Adicionalmente, la composición cosmética puede comprender adicionalmente un ingrediente base para permear o migrar el medicamento o el ingrediente activo en los tejidos de la piel.
- Se puede proporcionar la formulación de la composición cosmética como una forma adecuada de acuerdo al uso deseado y propiedades de la composición cosmética, y los ejemplos de la formulación incluyen soluciones acuosas, agentes solubilizantes, emulsiones, aceites, geles, pastas, ungüentos, aerosoles, sistemas de di-capas de agua-aceite o sistemas de tri-capas de agua-aceite-polvo. Se proporcionan los ejemplos de la formulación únicamente para ejemplificar y no se interpretan como limitantes de la formulación y forma de la composición cosmética de la presente invención.
- El ingrediente activo puede estar presente en una cantidad de 0.001% en peso a 50% en peso, preferiblemente 0.01% en peso a 20% en peso, con base en el peso total de la composición cosmética, pero el contenido puede ser controlado adecuadamente de acuerdo con los contenidos de los ingredientes, distintos del ingrediente activo, contenido en la formulación o la composición cosmética, y no se interpretan como limitantes del ingrediente activo de acuerdo con la presente invención.
- La presente invención está dirigida a una composición antipirética que comprende un extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* como un ingrediente activo.
- Se puede producir el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* de acuerdo con un método de producción común de extractos de plantas. Por ejemplo, se produce el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* extrayendo hojas, ramas, tallos, raíces o cáscaras de *Stauntonia Hexaphylla*, o granos obtenidos triturando estas sustancias (a continuación, simplemente indicados como "granos"), preferiblemente hojas de ramas, tallos, raíces o cáscaras de *Stauntonia Hexaphylla*, con un solvente de extracción, o extrayendo el mismo con un solvente de extracción y después fraccionando el extracto crudo resultante con un solvente de fraccionamiento.

Las hojas de *Stauntonia Hexaphylla* se cosechan en una gran cantidad en comparación con otros sitios de los mismos, por lo tanto son fáciles de producir y exhiben efectos antiinflamatorios superiores. Por consiguiente, el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* es preferiblemente un extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*.

5 El solvente de extracción puede comprender al menos uno seleccionado del grupo que consiste en agua y solventes orgánicos. El solvente orgánico puede ser un solvente polar tal como alcohol que tiene 1 a 5 átomos de carbono, alcohol diluido, acetato de etilo o acetona, un solvente no polar tal como éter, cloroformo, benceno, hexano o diclorometano, o una mezcla de los mismos.

10 El solvente de extracción del extracto de *Stauntonia Hexaphylla* preferiblemente comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en agua, alcoholes que tienen 1 a 5 átomos de carbono, alcohol diluido y mezclas de los mismos, más preferiblemente comprende uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en agua, alcoholes que tienen 1 a 4 átomos de carbono y una mezcla los mismos, y aún más preferiblemente comprende agua. La extracción se puede llevar a cabo de 50°C a 150°C, o 75°C a 120°C, o 90°C a 115°C pero la presente invención no está limitada a los mismos. Adicionalmente, el tiempo de extracción no está limitado particularmente, pero puede ser 10 minutos a 12 horas, o 30 minutos a 8 horas, o 2 horas a 6 horas.

15 Se puede producir el extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* de acuerdo con la presente invención de acuerdo con un método general de producción de extractos de planta. Específicamente, el método puede ser extracción en caliente incluyendo extracción en agua caliente, extracción por inmersión en frío, extracción por inmersión en caliente, extracción ultrasónica o similar y se puede llevar a cabo usando un extractor ordinario, extractor ultrasónico o fraccionador.

20 Adicionalmente, el extracto extraído con un solvente se puede someter entonces a fraccionamiento usando al menos un solvente seleccionado del grupo que consiste en hexano, cloroformo, cloruro de metileno, acetato de etilo, éter de etilo, acetona, butanol, agua y mezclas de los mismos. El solvente usado para fraccionamiento puede ser una combinación de dos o más tipos y puede ser usado secuencialmente o en combinación de acuerdo con la polaridad del solvente para preparar los extractos del solvente respectivos.

25 Una fracción del extracto de solvente de *Stauntonia Hexaphylla* preparado, específicamente, una fracción del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* es preferiblemente una fracción de acetato de etilo, una fracción de cloroformo o fracción de butanol, más preferiblemente una fracción de acetato de etilo o una fracción de cloroformo, incluso más preferiblemente, una fracción de acetato de etilo.

30 El extracto preparado o la fracción obtenida por el procedimiento de fraccionamiento se pueden someter después a filtración, concentración y/o secado para retirar el solvente. Específicamente, se puede llevar a cabo la filtración usando un papel de filtro o filtro en vacío, se puede llevar a cabo la concentración por concentración en vacío usando un concentrador de vacío, por ejemplo, un evaporado rotatorio, y el secado puede ser, por ejemplo, liofilización.

35 Se puede usar la composición antipirética como un medicamento o para aplicaciones médicas o farmacéuticas. A este respecto, la composición antipirética puede ser una composición médica, por ejemplo, un fármaco antipirético, o un fármaco antipirético y analgésico.

Cuando se usa la composición antipirética para aplicaciones médicas o farmacéuticas, se puede usar la composición antipirética para inhibir el calor generado anormal (fiebre) o tratar o prevenir fiebre anormal acompañada por enfermedades.

40 A este respecto, la presente invención está dirigida a una composición antipirética que comprende el extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* como un ingrediente activo. La composición antipirética que comprende el extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*, como un ingrediente activo, se puede usar para inhibir, tratar, aliviar o prevenir fiebre anormal acompañada por enfermedades o trastornos y puede ser específicamente un fármaco antipirético y analgésico.

45 Con respecto a la composición antipirética que comprende el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* como un ingrediente activo, el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* es un extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*, preferiblemente una fracción de cloroformo, una fracción de acetato de etilo o una fracción de butanol del extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*, más preferiblemente, una fracción de acetato de etilo o una fracción de cloroformo del extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*, incluso más preferiblemente una fracción de acetato de etilo del extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*.

50 La fiebre anormal indica una temperatura corporal anormalmente alta.

Se usa el fármaco antipirético para eliminar fiebre anormal y se refiere a una medicina usada para disminuir una temperatura corporal elevada anormalmente a un nivel razonable. Los medicamentos antipiréticos previamente reportados incluyen antipirina, antifebrina, aspirina, salipirina y similares. El fármaco antipirético también es llamado un "fármaco antipirético y analgésico" porque generalmente tiene el efecto de aliviar el dolor.

La composición antipirética que comprende el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* como un ingrediente activo se puede aplicar directamente a animales incluyendo humanos. Los animales son una familia de organismos, en contraste a plantas, que principalmente absorben materias orgánicas como nutrientes y se diferencian en órganos digestivos, excretorios y respiratorios, y son preferiblemente mamíferos, más preferiblemente humanos.

5 Se puede usar el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* sólo en la composición antipirética y se puede añadir adicionalmente un vehículo, excipiente, diluyente o adyuvante aceptable farmacéuticamente.

Más específicamente, cuando la composición que comprende el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* se puede usar como un medicamento o para aplicaciones médicas o farmacéuticas, se puede mezclar el extracto de *Stauntonia Hexaphylla* con un vehículo o excipiente aceptable farmacéuticamente o ser diluido con un agente de dilución de acuerdo con un método general anteriormente usado.

10 En este caso, un contenido del extracto de *Stauntonia Hexaphylla* en la composición puede ser 0.001% en peso a 99.9% en peso, 0.1% en peso a 99% en peso o 1% en peso a 50% en peso, pero la presente invención no está limitada a esto. El contenido del extracto puede ser controlado a un nivel razonable de acuerdo con la forma de uso y método de la composición.

15 Los ejemplos del vehículo, excipiente o diluyente aceptable farmacéuticamente incluyen, pero no están limitados a, uno o más seleccionado del grupo que consiste en lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, caucho de acacia, alginato, gelatina, fosfato cálcico, silicato cálcico, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, aceite mineral, dextrina, carbonato de calcio, propilenglicol, parafina líquida y solución salina fisiológica, pero cualquier vehículo, excipiente o diluyente ordinario puede usarse sin limitación a estas sustancias. El vehículo o el excipiente se pueden usar en combinación de dos o más tipos.

20 Adicionalmente, la composición antipirética puede comprender adicionalmente rellenos ordinarios, extendedores, aglutinantes, agentes de desintegración, agentes antiaglutinantes, agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes de control del pH, nutrientes, vitaminas, electrolitos, ácido algínico y sales de los mismos, ácido péctico y sales de los mismos, coloides protectores, glicerina, agentes saborizantes, emulsificantes o conservantes. Se pueden añadir éstos ingredientes individualmente o en combinación al extracto de *Stauntonia Hexaphylla*, el ingrediente activo.

25 Adicionalmente, la composición antipirética puede comprender además, adicionalmente al ingrediente activo, una sustancia bien conocida considerada por tener efecto antipirético.

30 Adicionalmente, el fármaco antipirético puede comprender además, adicionalmente al ingrediente activo, un compuesto bien conocido o extracto de planta considerado por tener efecto antipirético y puede estar presente en una cantidad de 0.1 partes en peso a 99.9 partes en peso o 0.5 partes en peso to 20 partes en peso, con base en 100 partes en peso del ingrediente activo.

35 Se puede administrar la composición oralmente o parenteralmente cuando se usa para un medicamento y la composición puede ser, por ejemplo, administrada a través de diferentes rutas que incluyen rutas orales, transdérmicas, subcutáneas, intravenosas y musculares.

Adicionalmente, una formulación de la composición se puede variar de acuerdo a la forma de uso y se puede formular la composición por un método bien conocido en la técnica de manera que el ingrediente activo es liberado rápidamente, sostenido o retrasado después de la administración a un animal mamífero.

40 Generalmente, las preparaciones sólidas para administración oral incluyen comprimidos, cápsulas, cápsulas blandas o duras, pastillas, polvos, gránulos y similares. Estas preparaciones pueden prepararse, por ejemplo, mezclando uno o más excipientes, tales como almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa y gelatina. Adicionalmente, además de un excipiente simple, también pueden usarse lubricantes tales como estearato de magnesio o talco. Las preparaciones líquidas para administración oral incluyen suspensiones, líquidos y soluciones para uso interno, emulsiones, jarabes y similares. Las preparaciones líquidas pueden comprender diversos excipientes, por ejemplo, agentes humectantes, agentes dulcificantes, agentes saborizantes y conservantes, además de agua y parafina líquida, que son diluyentes simples de uso común.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen cremas, lociones, ungüentos, yesos, líquidos y soluciones, aerosoles, extractos fluidos, elixires, infusiones, bolsitas, parches, inyecciones y similares.

50 Adicionalmente, la composición de la presente invención pueden ser formulada usando un método razonable bien conocido en la técnica al cual la presente invención pertenece o un método descrito en la Remington's Pharmaceutical Science (edición reciente, Mack Publishing Company, Easton PA).

55 Se puede determinar la dosificación de la composición en consideración del método de dosificación, edad y sexo de los tomadores, severidad y condiciones de los pacientes, absorción del ingrediente activo en el cuerpo, proporción de inactivación y medicamentos usados conjuntamente con ellos. La dosificación puede ser por ejemplo 0.1 mg/kg (peso corporal) a 500 mg/kg (peso corporal), 0.1 mg/kg (peso corporal) a 400 mg/kg (peso corporal) o 1 mg/kg (peso corporal)

a 300 mg/kg (peso corporal), con base en el ingrediente activo por día. Se puede administrar la composición una vez en varias porciones. La dosificación no se interpreta como limitante del alcance de la presente invención en ningún aspecto.

Efectos ventajosos

- 5 El extracto de *Stauntonia Hexaphylla* de la presente invención es un extracto vegetal derivado comestible, está libre de problemas asociados con efectos secundarios y es seguro, se determina para tener considerablemente baja citotoxicidad como un resultado del análisis MTT y exhibe efectos antiinflamatorios y antipiréticos, siendo usado así para medicinas o cosméticos que requieren efectos antiinflamatorios y medicamentos que requieren efectos antipiréticos.
- 10 Breve descripción de los dibujos
- El anterior y otros objetivos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderá más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada conjuntamente con los dibujos que acompañan, en los que:
- 15 La FIG. 1 es un diagrama esquemático que ilustra un procedimiento para preparar un extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* y fracciones de solvente del mismo de acuerdo con una realización de la presente invención;
- La FIG. 2 es un diagrama esquemático que ilustra un procedimiento de preparación de un extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* y fracciones de solvente del mismo de acuerdo con una realización de la presente invención;
- 20 La FIG. 3 es una gráfica que muestra resultados de medición de la citotoxicidad del extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* usando líneas celulares de RAW264.7 por el ensayo MTT de acuerdo con una realización de la presente invención, en la que + indica tratado con LPS (1 µg/ml) o el extracto, - indica no tratado, un valor de SHL de un eje horizontal representa una dosificación (µg/ml) del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* y un eje vertical representa citotoxicidad (%) en comparación con un grupo de control no tratado con ninguna muestra;
- 25 La FIG. 4 es una gráfica que muestra resultados de medición de citotoxicidad del extracto de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* usando líneas celulares de RAW264.7 por el ensayo MTT de acuerdo con una realización de la presente invención, en la que + indica tratado con LPS (1 µg/ml) o el extracto, - indica no tratado, un valor de SH de un eje vertical representa una dosificación (µg/ml) del extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla*;
- 30 La FIG. 5 es una gráfica que muestra secreción de NO medida para determinar efectos antiinflamatorios del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* usando líneas celulares de RAW264.7 de acuerdo con una realización de la presente invención, en la que + indica tratado junto con LPS (1 µg/ml), - indica no tratado con LPS (1 µg/ml), un valor de SHL de un eje horizontal representa una dosificación (µg/ml) del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* y un eje vertical representa secreción de NO relativa (%) en comparación con un grupo tratado únicamente con LPS;
- 35 La FIG. 6 es una gráfica que muestra niveles de ARNm de citoquinas asociadas con inflamación medidas para determinar efectos antiinflamatorios del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* de acuerdo con una realización de la presente invención, en la que + indica tratado con LPS (1 µg/ml) o una fracción de solvente, - indica no tratado con ninguna muestra, y un valor de un eje horizontal representa una dosificación (µg/ml) del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*;
- 40 La FIG. 7 es una gráfica que muestra la expresión de iNOS y COX-2 medido para determinar efectos antiinflamatorios del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* de acuerdo con una realización de la presente invención en la que, + indica tratado con LPS (1 µg/ml) o una fracción del solvente, - indica no tratado con ninguna muestra, y un valor de un eje horizontal representa una dosificación (µg/ml) del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*;
- 45 La FIG. 8 es una gráfica que muestra niveles de ARNm transferido de citoquinas asociadas con inflamación detectadas por RT-PCR para determinar efectos antiinflamatorios del extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* de acuerdo con una realización de la presente invención usando células primarias de macrófagos, en la que + indica tratado con LPS (1 µg/ml), - indica no tratado con LPS (1 µg/ml), un valor de SHL de un eje horizontal representa una dosificación (µg/ml) del extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* y un eje vertical que presenta un tipo de citoquinas;
- 50 La FIG. 9 es una gráfica que muestra niveles producidos de TNF-α entre las citoquinas asociadas con inflamación para determinar efectos antiinflamatorios del extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* usando células primarias de macrófagos de acuerdo con una realización de la presente invención, en la que + indica tratado junto con LPS (1 µg/ml), - indica no tratado con LPS, un eje horizontal representa una dosificación (µg/ml) del extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* y un eje vertical representa un nivel de TNF-α producido;

La FIG. 10 es una gráfica que muestra la citotoxicidad del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* medida por el ensayo MTT usando líneas celulares de RAW264.7 de acuerdo con una realización de la presente invención, en la que + indica tratado con LPS (1 µg/ml) o una fracción de solvente, - indica no tratado con ninguna muestra, valores de un eje horizontal representan dosificaciones (µg/ml) de diferentes fracciones de solvente del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* y un eje vertical representa citotoxicidad (%) en comparación con un grupo control no tratado con ninguna muestra;

La FIG. 11 es una gráfica que muestra niveles de NO secretados medios para determinar efectos antiinflamatorios de diferentes fracciones de solvente del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* usando líneas celulares de RAW264.7 de acuerdo con una realización de la presente invención, en la que + indica tratado con LPS (1 µg/ml) o la fracción de solvente, - indica no tratado con ninguna muestra, los caracteres y valores de un eje horizontal representan tipos y dosificaciones (50 µg/ml) de diferentes fracciones de solvente del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* y un eje vertical representa secreción de NO relativa (%) en comparación con un grupo control tratado únicamente con LPS;

La FIG. 12 es una gráfica que muestra actividad inhibitoria de COX-2 media con base en la actividad de COX-2 para determinar efectos antiinflamatorios de las fracciones de solvente del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* de acuerdo con una realización de la presente invención, en la que solventes que distinguen diferentes curvas representan solventes de fraccionamientos, un eje horizontal representa tiempo pasado después del tratamiento y un eje vertical representa actividad de COX-2;

La FIG. 13 es una gráfica que muestra resultados de alivio de fiebre inducida por LPS con el fin de determinar efectos antiinflamatorios del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* usando animales de prueba de acuerdo con una realización de la presente invención, en la que un valor de un eje horizontal representa tiempo (hora, h) pasado después de la administración con muestras y un valor de un eje vertical representa una temperatura corporal medida; y

La FIG. 14 es una gráfica que muestra resultados de alivio de fiebre inducida por LPS con el fin de determinar efectos antiinflamatorios de las fracciones del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* de acuerdo con una realización de la presente invención que usa animales de prueba, en la que un valor de un eje horizontal representa tiempo (hora, h) pasado después de la administración con muestras y valores de un eje vertical representan variación en la temperatura corporal cambiada a partir de una temperatura corporal medida antes de la administración de la muestra, es decir, el valor calculado restando una temperatura corporal de un animal de prueba medido antes de la administración de la muestra de una temperatura corporal del animal de prueba medida en el tiempo correspondiente.

Descripción detallada de la invención

A continuación, se describirán las configuraciones y efectos de la presente invención en mayor detalle con referencia a ejemplos específicos y ejemplos comparativos para mejor entendimiento de la presente invención.

### **Ejemplo 1: Preparación del extracto y fracción de *Stauntonia Hexaphylla***

#### 1-1. Preparación del extracto de *Stauntonia Hexaphylla*

Se preparó un extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* a 110°C usando agua caliente y 10 kg de una hoja de *Stauntonia Hexaphylla* de acuerdo con un método de extracción en agua caliente ilustrado en la FIG. 1. Adicionalmente, se preparó un extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* a 100°C usando 40L de agua caliente y 2,100g de una fruta de *Stauntonia Hexaphylla* de acuerdo con un método de extracción en agua caliente descrito en la FIG. 2.

Más específicamente, se añadieron 200 L de agua destilada a 10 kg de una hoja de *Stauntonia Hexaphylla* lavada con agua destilada, y se realizó entonces la extracción en agua caliente mientras se calentó la mezcla resultante en una caldera de medicina eléctrica a 100°C por 3 horas. Adicionalmente, se añadieron 40 L de agua destilada a 2, 100 g de una fruta de *Stauntonia Hexaphylla* lavada con agua destilada, y se realizó entonces la extracción en agua caliente mientras se calentó la mezcla resultante en una caldera de medicina eléctrica a 100°C por 3 horas.

Después de la extracción, se filtró cada extracto a través de una tela de filtro de malla 400 y se concentró el filtrado resultante usando un concentrador rotatorio de vacío. El residuo dejado después de la filtración se extrajo, se filtró y se concentró bajo vacío dos veces más en la misma manera como el anterior usando la cantidad equivalente de agua destilada.

Se liofilizaron el extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* y el extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* preparados por el procedimiento usando un liofilizador. Se obtuvo 1 kg del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* a través de la liofilización. Como resultado, se determinó el rendimiento obtenido por el extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* para ser 10%. Adicionalmente, se obtuvieron 148 g del extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* a través de la liofilización. Como resultado, se determinó un rendimiento obtenido por el extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* para ser 7%.

1-2. Preparación de las fracciones del extracto de *Stauntonia Hexaphylla*

Se prepararon las fracciones del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* y el extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* de acuerdo con el método ilustrado en la FIG. 1 o 2.

5 Específicamente, se disolvieron completamente 250g del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* en 5L de agua destilada, la solución resultante se cargó en una columna de fraccionamiento y se añadieron 5L de hexano a esta, seguido por mezclado y fraccionamiento para separar una capa de hexano como una capa soluble en hexano a partir de una capa acuosa como una capa insoluble en hexano. Se recolectó la capa de hexano para preparar una solución de fracción de hexano.

10 Se añadieron 5L de cloroformo a la solución restante (capa acuosa), seguido por mezclado y fraccionamiento, para separar una capa de cloroformo como una capa soluble en cloroformo y una capa acuosa como una capa insoluble en cloroformo. Se recolectó la capa de cloroformo para preparar una solución de fracción de cloroformo.

15 Se añadieron 5L de acetato de etilo a la solución restante (capa acuosa), seguido por mezclado y fraccionamiento, para separar una capa de acetato de etilo como una capa soluble en acetato de etilo y una capa acuosa como una capa insoluble en acetato de etilo. Se recolectó la capa de acetato de etilo para preparar una solución de fracción de acetato de etilo.

Se añadieron 5L de butanol a la solución restante (capa acuosa), seguido por mezclado y fraccionamiento, para separar una capa de butanol como una capa soluble en butanol y una capa acuosa como una capa insoluble en butanol. Se recolectó la capa de butanol para preparar una solución de fracción de butanol.

20 Se concentró la capa insoluble en butanol dejada después del fraccionamiento y separación de la capa soluble en butanol para retirar el solvente orgánico restante, preparando por lo tanto una solución de fracción de agua.

25 Se filtraron las soluciones de fracción respectivas obtenidas de esta forma en un sistema de filtración en vacío, se concentraron y liofilizaron a -20°C para retirar completamente los solventes, que usaron para el presente experimento. A través del procedimiento, se obtuvieron y se usaron como muestras 0.02 g de una fracción de hexano (0.015%), 0.67 g de una fracción de cloroformo (0.27%), 2g de una fracción de acetato de etilo (1.05%) y 68.75 g de una fracción de butanol (27.5%).

30 En el procedimiento de preparación, la fracción de hexano resultó ser inadecuada para uso porque podría causar problemas asociados con procedimientos industriales debido al rendimiento excesivamente bajo. Los extractos y fracciones obtenidos se almacenan en frío hasta que se usaron para los experimentos. Adicionalmente, se encontró que las acciones de butanol y agua tienen alto rendimiento, y se consideraron así excelentes la eficiencia económica y capacidad de aplicación industrial debido a los rendimientos de fracción altos.

35 Adicionalmente, se preparó una fracción del extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* por un método que incluye disolver completamente 40g del extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphyllae* en 1L de agua destilada, añadiendo respectivamente 1L de solventes de fraccionamiento, es decir, hexano, cloroformo, acetato de etilo y butanol en una columna fraccionamiento en la misma forma que anteriormente, seguido por mezcla de fraccionamiento, separando por lo tanto las capas solubles en solvente.

40 Las soluciones de fracción del extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* obtenidas de esta forma se filtraron en un sistema de filtración en vacío, se concentraron y liofilizaron a -20°C para retirar completamente los solventes, que se usaron después en los presentes experimentos. A través del procedimiento se obtuvieron y se usaron como muestras 0.1 g de una fracción de hexano, 0.6 g de una fracción de cloroformo, 2g de una fracción de acetato de etilo y 15 g de una fracción de butanol.

**Ejemplo 2: Prueba de citotoxicidad de extractos y fracciones**

45 Para determinar la citotoxicidad del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*, el extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* y la fracción de extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* preparada en el Ejemplo 1, se usaron células primarias de macrófagos de ratón, células de RAW264.7 disponibles de ATCC.

Se obtuvieron DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture Ham's F12), FBS (suero bovino fetal), Lglutamina y penicilina-estreptomocina usados para cultivar las células se obtuvieron de Gibco/BRL (USA).

50 Se cultivaron las células de The RAW264.7 en un medio DMEM/F12 suplementado con 10% de FBS, 1% de penicilina-estreptomocina y 1% L-glutamina y se incubaron a 37°C y a una humedad predeterminada en un incubadora de CO2 (5% de CO2/95% de aire).

Se cultivaron las células hasta una confluencia de aproximadamente 80% en un plato de cultivo, y se enjuagó una monocapa de las células con PBS (pH 7.4) y después se lavó. Después, se trataron las células con 0.25% de tripsina y 2.56 mmol/L de EDTA y después se cultivaron de paso. Se alimentaron las células con un medio fresco cada dos días.

Se sembraron las células cultivadas en una placa 48 de pozos a una densidad de 50,000 de células/pozo y se cultivaron adicionalmente por 24 horas. Después de 24 horas, se cultivaron adicionalmente un grupo control tratado únicamente con LPS, sin tratar con ninguna muestra, y grupos experimentales tratados con LPS y soluciones de los extractos de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* y fracciones de los mismos obtenidos en el Ejemplo 1 preparados en diferentes concentraciones en DMSO que se había determinado que no tenían ningún efecto en la viabilidad celular por 24 horas, se retiraron las soluciones de cultivo y se midió el número de células viables mediante el ensayo MTT. Se realizó el ensayo de MTT por el siguiente método.

Primero, se retiró el medio de cultivo, cada pozo se trató con 1 mL de un medio de DMEM/F12 que contiene 1 mg/mL de MTT y se cultivaron adicionalmente las células a 37°C y una humedad predeterminada en una incubadora de CO<sub>2</sub> por 4 horas. Después de retirar el medio, se eliminó una sal de bromuro de tetrazolio, cristales de formazano producidos en cada pozo se disolvieron en 200 µl de DMSO, y se midió la absorbancia en una longitud de onda de 540 nm en un lector de microplacas (BIO-RAD) para determinar la viabilidad celular.

Se expresaron los resultados del tratamiento con el extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* como promedios de valores medidos obtenidos repitiendo la prueba tres veces y se muestran en la FIG. 3. Se expresaron los resultados del tratamiento con el extracto de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* como promedios de los valores medidos obtenidos repitiendo la prueba tres veces y se muestran en la FIG. 4. Se expresaron los resultados del tratamiento con la fracción del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* como promedios de los valores medidos obtenidos repitiendo la prueba tres veces y se muestran en la FIG. 10.

Como se puede ver a partir de la FIG. 3, todos los grupos tratados con el extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* preparados en el Ejemplo 1-1 a diferentes concentraciones, específicamente, a diferentes concentraciones que varían desde 50 µg/ml a 200 µg/ml, no tienen efectos en la proliferación celular incluso después de 24 horas, en comparación con el grupo control tratado únicamente con LPS, sin tratar con ninguna muestra. A partir de los resultados, se determinó que el extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* no tiene citotoxicidad a una concentración de menos de o igual 200 µg/ml.

Adicionalmente, como se puede ver a partir de la FIG. 4, como un resultado en comparación entre grupos tratados con el extracto de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* preparado en el Ejemplo 1-1 a diferentes concentraciones, específicamente, a diferentes concentraciones que varían desde 50 µg/ml a 200 µg/ml, por 24 horas, y el grupo control tratado únicamente con LPS, sin tratar con ninguna muestra, todos los grupos tratados no tuvieron efectos en la proliferación celular. A partir de los resultados, se determinó que el extracto de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* no tenía citotoxicidad a una concentración de menos de o equivalente a 200 µg/ml.

Adicionalmente, se puede ver a partir de la FIG. 10, en caso de las fracciones del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* preparadas en el Ejemplo 1-2, un grupo experimental tratado con 25 µg/ml de la fracción de hexano exhibió una disminución significativa en la viabilidad celular, que demostró que el grupo experimental tenía citotoxicidad. Adicionalmente, un grupo experimental tratado con 100 µg/ml de la fracción de acetato de etilo exhibió una ligera e insignificante disminución en la viabilidad celular, mientras un grupo experimental tratado con 200 µg/ml de la fracción de acetato de etilo exhibió una disminución significativa en la viabilidad celular, que demostró que la fracción de acetato de etilo fue segura en una concentración de menos de o igual a 100 µg/ml. En el caso de otras fracciones de solvente, la viabilidad celular se mantuvo a 50 µg/ml o 100 µg/ml, y las fracciones que usan solventes diferentes a hexano, como solventes de fraccionamiento, no tuvieron citotoxicidad y fueron seguras, cuando se trataron con el extracto a una concentración de 50 µg/ml.

### **Ejemplo 3: determinación del efecto antiinflamatorio del extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* y fracción del mismo**

Se usaron las células de RAW 264.7 cultivadas en el Ejemplo 2 para determinar el efecto antiinflamatorio del extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* y fracciones del mismo preparados en el Ejemplo 1.

Se trataron las células con el extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* o fracciones de solvente del mismo preparados en el Ejemplo 1, junto con LPS, y cultivados por 24 horas en la misma forma como en el Ejemplo 2. Se centrifugo la solución cultivada a 3,000 rpm por 5 y se separó un sobrenadante. El sobrenadante se trató y se hizo reaccionar con la cantidad igual de reactivo de Griess (1% de sulfanilamida, 0.1% de naitil-etilendiamina dihidrocloruro, 2% de ácido fosfórico, Promega, EEUU), y se midió la secreción de NO a 540 nm. Se mostraron los resultados en las FIGS. 5 y 11.

Como se puede ver a partir de la FIG. 5, se encontró que un grupo control no tratado con LPS exhibe baja secreción de NO. Por otra parte, se encontró que un grupo experimental tratado con LPS exhibe un prominente incremento en la secreción de NO debido a la inflamación inducida por LPS. Adicionalmente, a pesar del tratamiento con LPS, los grupos tratados con el extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* preparados en el Ejemplo 1 exhibieron una disminución dependiente de la concentración en la secreción de NO. En particular, un grupo tratado con 100 µg/ml del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* disminuye la secreción de NO a 80% de la inflamación inducida del grupo control por LPS, un grupo tratado con 200 µg/ml del extracto en agua caliente de

hoja de *Stauntonia Hexaphylla* disminuye la secreción de NO a aproximadamente 70% de la inflamación inducida del grupo control por LPS, que demuestra que el extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* tiene efectos antiinflamatorios.

5 El extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia celular y se determinó así para no tener citotoxicidad, cuando se trató a una concentración de 200 µg/ml en el Ejemplo 2. Por consiguiente, se determinó el extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* para no tener citotoxicidad, ser seguro y exhibir efecto antiinflamatorio superior.

10 Adicionalmente, como se puede ver a partir de la FIG. 11, la fracción de agua casi no exhibió disminución de la secreción de NO, cuando se trató con el extracto a una concentración de 50 µg/ml que se había determinado para permitir que todas las fracciones fueron seguras en el Ejemplo 2. Adicionalmente, se encontró que la fracción de butanol exhibe secreción de NO que corresponde a 60% del grupo control y se considera así que tenía efecto antiinflamatorio. Entre tanto, la fracción de cloroformo y la fracción de acetato de etilo del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* exhibió secreciones de NO que fueron iguales a o menos de 20% del grupo control. Esto demostró que la fracción de acetato de etilo y la fracción de cloroformo tuvieron efecto inhibitorio considerablemente excelente en la producción de NO a una concentración que no tiene efecto en la citotoxicidad.

15 **Ejemplo 4: Determinación de un efecto antiinflamatorio a través de medición de niveles de ARNm de citoquina asociados con inflamación**

20 Para determinar el efecto antiinflamatorio del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* que ha sido determinado para exhibir efecto antiinflamatorio superior con base en la secreción de NO en el Ejemplo 3 nuevamente, la variación en el nivel de ARNm de citoquina asociado con la respuesta inflamatoria, específicamente, se determinó iNOS usando células primarias de macrófagos.

25 Con el fin de obtener células primarias de macrófagos, 32 ratones machos de 4 semanas de edad (ratón ICR) que tienen peso corporal de 15g a 20g y 32 ratones Sprague-Dawley se obtuvieron de Samtako Inc. (Corea), los respectivos ratones se clasificaron en 16 grupos, y se ubicaron y criaron 4 ratones por grupo. Los animales de ensayo se criaron a una temperatura de 20°C a 24°C y a una humedad de 60% a 70% bajo la condición de iluminación día-noche en intervalos de 12 horas, y se alimentaron libremente con agua y pienso. El pienso usado aquí fue un pienso sólido (Samyang Feed Co., Corea). Se criaron los animales de prueba bajo las mismas condiciones por 7 días, adaptados a entornos de laboratorio y usados para pruebas posteriores.

30 Se cultivaron las células primarias de macrófagos (2X10<sup>6</sup> células/ml) obtenidas de los animales de prueba en un medio de inanición de suero por 24 horas. Después de cultivar, las células se trataron con LPS (0.5 mg/ml) o LPS (0.5 mg/ml) diferentes concentraciones del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* y se cultivaron por 24 horas. Después de 24 horas, se aisló el ARN de las células cultivadas. El aislamiento de ARN se realizó por el siguiente método.

35 Específicamente, las células cultivadas se lisaron en una solución de GIT (kit de extracción de ARN total easy BLUE, Intron Biotechnology Inc., Corea), y se centrifugaron a temperatura ambiente a 10,000 rpm por 5 minutos, y se descartó un sobrenadante para obtener una pella. Se añadió 1 ml de solución DEPC al 0.1% (Sigma, EEUU) a la pella, se centrifugo la mezcla resultante a 12,000 rpm por 2 minutos nuevamente, y se descartó el sobrenadante para obtener una pella. Se añadieron 0.5 ml de guanidinio a la pella obtenida, seguido de vórtice. Adicionalmente, se añadieron 0.5 ml de una solución mixta de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) a la mezcla resultante, seguido por vórtice y centrifugación a 12,000 rpm por 3 minutos para obtener un sobrenadante. Se mezcló homogéneamente el sobrenadante con una cantidad igual de isopropilalcohol y se dejó estar quieto a -20°C por 30 minutos. Después, se centrifugo la mezcla resultante a 12,000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante, y se lavó la pella con una solución de etanol acuosa al 70% y se secó bajo vacío para aislar el ARN.

45 Se disolvió el ARN aislado en 1 ml de una solución DEPC al 0.1% y se usó para medir un contenido de ARNm de citoquina asociada a la inflamación. El contenido de ARNm de la citoquina asociada la inflamación, iNOS, se midió de acuerdo con el siguiente método.

50 Se añadió la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen, EEUU) a 3 mg del ARN aislado, seguido por incubación a 42°C por 105 minutos y después a 70°C por 15 minutos, para obtener ADNc. El ADNc obtenido se cuantificó por PCR en tiempo real. Las secuencias de cebador y condiciones de prueba usadas para el PCR en tiempo real se muestran en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

ARNm Sentido	Secuencia de cebador		Tm recocado (°C)
iNOS	Sentido	CAGAGGACCCAGAGACAAG	50.8
	Anti-sentido	ACCTGATGTTGCCATTGTTG	

Como un resultado del PCR en tiempo real, se muestra una imagen que muestra comparación del contenido de iNOS con contenido de  $\beta$ -actina en la FIG. 6.

Como se muestra en la FIG. 6, un grupo control no tratado con LPS no exhibió ARNm de citoquina asociada con la inflamación, iNOS, en lo absoluto, mientras un grupo únicamente tratado con LPS exhibe un nivel notablemente alto de ARNm de iNOS. Adicionalmente, un grupo tratado con el extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* preparado en el Ejemplo 1, a pesar de ser tratado con LPS, exhibe una disminución dependiente de la concentración en el contenido de ARNm de iNOS. La disminución dependiente de la concentración en el contenido de ARNm de iNOS tras el tratamiento con el extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* demostró que el extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* exhibió efectos antiinflamatorios superiores.

#### 10 **Ejemplo 5: Determinación de la actividad inhibitoria en la expresión de iNOS y COX-2 asociada con inflamación**

Para determinar el efecto antiinflamatorio del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* que se ha determinado que exhibe un efecto antiinflamatorio superior con base en la secreción de NO y disminución en el contenido de ARNm de iNOS en los Ejemplos 3 y 4 de nuevo, se confirmó la actividad inhibidora en la expresión de iNOS y COX-2.

15 Específicamente, se placaron las células primarias de macrófagos obtenidas en el Ejemplo 4 en una placa de 24 pozos a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/ml controlada usando un medio DMEM y preincubadas en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% por 18 horas. Después de precultivar, se trataron las células con el extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* en diferentes concentraciones (0.1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml y 200  $\mu$ g/ml), se cultivaron por una hora, tratadas con LPS (1  $\mu$ g/ml) y cultivadas bajo las mismas condiciones como el precultivo.

20 Después de cultivar por 24 horas, se recolectaron las células, lavadas con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) tres veces, disueltas en amortiguador del lisis celular (50 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM de NaCl, 1% de Nonidet P-40, 2 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1 mM de NaVO<sub>3</sub>, 10mM de NaF, 1 mM de dithiothreitol, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 25  $\mu$ g/ml de aprotinina, 25  $\mu$ g/ml de leupeptina) a 4°C por 30 minutos, y se centrifugaron a 4°C y 15,000 rpm por 15 minutos para eliminar ingredientes de membrana celular.

25 La concentración de proteína se cuantificó mediante la estandarización de la albúmina de suero bovino (BSA) y usando el kit de ensayo de proteína Bio-Rad. Se cargaron 20  $\mu$ g de la proteína aislada en un mini gel SDS-PAGE al 10%, y se degeneraron y separaron, la proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD, Richmond, CA, EEUU) a 350 mA durante una hora. La membrana transferida de proteína se bloqueó en una solución de TTBS (0,1% de Tween 20 + TBS) que contenía 5% de leche descremada a temperatura ambiente durante 2 horas.

30 Un iNOS antiratón (Calbiochem, La Jolla, EEUU) como un anticuerpo usado para detectar una cantidad de iNOS expresado, y un COX-2 antiratón (BD Biosciences Pharmingen, SanJose, EEUU) como un anticuerpo usado para detectar una cantidad de COX-2 expresado, se diluyeron en solución de TTBS a 1:1,000, se hicieron reaccionar a temperatura ambiente por 2 horas y se lavaron con TTBS tres veces. Se diluyó a IgG antiratón conjugada con HRP (peroxidasa de rábano) (Amersham Pharmacia Biotech, LittleChalfont, RU) como un anticuerpo secundario a 1:5,000,

35 se hizo reaccionar a temperatura ambiente por 30 minutos, se lavó con TTBS tres veces, y se hicieron reaccionar con un sustrato de ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EEUU) por 30 segundos y se midieron las cantidades de iNOS y COX-2 expresadas usando un sistema de imagen de quimioluminiscencia (ATTO AE-9150 EZ-Capture II, Japón). Los resultados de las mediciones de las cantidades expresadas se muestran en la FIG. 7.

40 Como puede verse a partir de la FIG. 7, un grupo control no tratado con LPS no exhibió proteínas asociadas a la inflamación, es decir, iNOS y COX-2, mientras que un grupo tratado sólo con LPS exhibió niveles notablemente altos de iNOS y COX-2. Además, un grupo tratado con el extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* preparado en el Ejemplo 1, a pesar del tratamiento con LPS, exhibió una disminución dependiente de la concentración en los contenidos de iNOS y COX-2. La disminución dependiente de la concentración en los contenidos de iNOS y COX-2 tras el tratamiento con el extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* demostró que el extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* exhibió efectos antiinflamatorios superiores.

45

#### **Ejemplo 6: determinación del efecto antiinflamatorio a través de medición de niveles de ARNm de citoquina asociados con la inflamación**

Con el fin de determinar el efecto antiinflamatorio del extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* preparado en el Ejemplo 1, se determinó la variación en el contenido de ARNm de la citoquina asociada con la respuesta inflamatoria mediante células primarias de macrófagos.

50

Con el fin de obtener las células primarias de macrófagos, se obtuvieron 32 ratones machos de 4 semanas (ratón ICR) con un peso corporal de 15 g a 20 g y 32 ratones Sprague-Dawley de Samtako Inc. (Corea), los ratones respectivos se dividieron en 16 grupos, y se ubicaron y criaron 4 ratones por grupo. Los animales de ensayo se criaron a una temperatura de 20°C a 24°C y a una humedad del 60% al 70% bajo la condición de iluminación día-noche en intervalos de 12 horas y se alimentaron libremente con agua y pienso. El pienso usado aquí fue un pienso sólido (Samyang Feed Co., Corea). Los animales de ensayo se criaron en las mismas condiciones durante 7 días, adaptados a entornos de laboratorio y usados para pruebas posteriores.

55

Se cultivaron las células primarias de macrófagos ( $2 \times 10^6$  células/ml) obtenidas de los animales de prueba en un medio de inanición de suero por 24 horas. Después de cultivar, se trataron las células con LPS (0.5 mg/ml), o LPS (0.5 mg/ml) y diferentes concentraciones del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* se cultivaron por 24 horas. Después de 24 horas, se aisló el ARN de las células cultivadas. Se realizó el aislamiento del ARN por el siguiente método. Específicamente, las células cultivadas se lisaron en una solución de GIT (kit de extracción de ARN total easy BLUE, Intron Biotechnology Inc., Corea), y centrifugadas a temperatura ambiente a 10,000 rpm por 5 minutos, y se descartó un sobrenadante para obtener una pella. Se añadió 1 ml de solución DEPC al 0.1% (Sigma, EEUU) a la pella, se centrifugo la mezcla resultante a 12,000 rpm por 2 minutos nuevamente, y se descartó un sobrenadante para obtener una pella. Se añadieron 0.5 ml de guanidío para obtener la pella, seguido por vórtice. Adicionalmente, se añadieron 0.5 ml de una solución mixta de fenol/cloroformo/iso-amilalcohol (25:24:1) a la mezcla resultante, seguido por vórtice y centrifugación a 12,000 rpm por 3 minutos para obtener un sobrenadante. Se mezcló homogéneamente el sobrenadante con una cantidad igual de iso-propilalcohol y se dejó estar quieto a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Después, la mezcla resultante se centrifugo a 12,000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante, y se lavó la pella con una solución de etanol acuosa al 70% y se secó bajo vacío para ARN aislado.

El ARN aislado se disolvió en 1 ml de una solución de DEPC al 0,1% y luego se usó para medir un contenido de ARNm de citoquinas asociadas con la inflamación. Se midieron los contenidos de ARNm de las citoquinas asociadas con la inflamación, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF-a, mediante el siguiente método.

Se añadió la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen, EEUU) a 3 mg del ARN aislado, seguido de incubación a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 105 minutos y a continuación a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos, para obtener ADNc. El ADNc obtenido se cuantificó por PCR en tiempo real. Las secuencias de cebador y las condiciones de prueba usadas para el PCR en tiempo real se muestran en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2

ARNm Objetivo	Secuencia del cebador		Tm Recocido ( $^{\circ}\text{C}$ )
TNF-a	Sentido	GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC	62.2
	Anti-sentido	ACATTCCGAGGCTCCAGTGAATTCCGG	
IFN- $\gamma$	Sentido	GCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG	50
	Anti-sentido	GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG	
IL-1 $\beta$	Sentido	TGCAGAGTTCCTACATGGTCAACC	55
	Anti-sentido	GTGCTGCCTAATGTCCCCTTGAATC	

Como un resultado del PCR en tiempo real, se muestra en la FIG. 8 una imagen que muestra la comparación de contenidos de IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF-a con contenido de  $\beta$ -actina.

Como se muestra en la FIG. 8, un grupo control no tratado con LPS no mostró los ARNm de citoquinas asociadas con la inflamación, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF-a, en absoluto, mientras que un grupo tratado sólo con LPS exhibió niveles notablemente altos de los ARNm de IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$ . Además, un grupo tratado con el extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* preparado en el Ejemplo 1, a pesar del tratamiento con LPS exhibió una disminución dependiente de la concentración en los contenidos de ARNm de IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , en particular, una disminución prominente en el contenido de ARNm de IL-1 $\beta$ .

**Ejemplo 7: determinación del efecto antiinflamatorio a través de medición del nivel de TNF-a de citoquinas asociadas con la inflamación,**

Para determinar los efectos antiinflamatorios del extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* que se ha determinado que exhibe un efecto antiinflamatorio superior con base en la variación en el contenido de ARNm de citoquina asociada con la respuesta inflamatoria en el Ejemplo 6, de nuevo, se confirmó la variación en TNF-a entre la citoquina asociada con la respuesta inflamatoria usando células primarias de macrófagos.

Las células primarias de macrófagos se obtuvieron cultivando animales de prueba de la misma manera como en el Ejemplo 6. Se cultivaron células primarias de macrófagos ( $2 \times 10^6$  células/ml) obtenidas de los animales de ensayo de la misma manera como en el Ejemplo 5. La medición de la cantidad de TNF-a producido se llevó a cabo usando un programa de análisis de imagen (UVIband) suministrado por los sistemas de formación de imágenes de fluorescencia UVITEC.

Específicamente, se escanearon por imagen las bandas de TNF-a y  $\beta$ -actina separadas por electroforesis de gel de agarosa a través de los sistemas de formación de imágenes de fluorescencia UVITEC. Los volúmenes de (intensidades) de bandas de TNF-a y bandas de  $\beta$ -actina de un grupo normal, un grupo de control inducido por LPS, y grupos experimentales tratados con diferentes concentraciones del extracto de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* se

cuantificaron a partir de las imágenes escaneadas usando un programa de análisis de imagen (UVIband). Se determinó el contenido de TNF-a como un contenido relativo de TNF-a con respecto a la  $\beta$ -actina expresada en el grupo normal (% relativo, TNF-a/ $\beta$ -actina) y se muestran los resultados en la FIG. 9.

- 5 Como se puede ver a partir de la FIG. 9, se determinó un grupo control tratado con LPS para exhibir un pequeño nivel de citoquina asociada con la inflamación, es decir, TNF-a, mientras un grupo tratado únicamente con LPS exhibe un nivel considerablemente alto de TNF-a. Adicionalmente, un grupo tratado con el extracto en agua caliente de fruta de *Stauntonia Hexaphylla* preparado en el Ejemplo 1, a pesar del tratamiento con LPS se determinó que exhibe una disminución dependiente de la concentración en el contenido de TNF-a.

#### **Ejemplo 8: Determinación del efecto inhibitorio de la fracción contra COX-2 (ciclooxigenasa-2)**

- 10 Para determinar el efecto antiinflamatorio de la fracción del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* que se ha determinado para exhibir un efecto antiinflamatorio superior con base en la secreción de NO en el Ejemplo 3 de nuevo, se confirmó la actividad inhibitoria contra la enzima COX-2.

- 15 Primero, se adaptaron ratones blancos machos Sprague-Dawley de 5 semanas de edad (Samtako Inc. Corea) a ambientes de laboratorio por 7 días y se usaron para pruebas. Se criaron los animales de prueba a una temperatura de 20°C a 24°C, y a una humedad de 60% a 70% bajo la condición de iluminación día-noche en intervalos de 12 horas 12-hour y se alimentaron libremente con agua y pienso. El pienso usado aquí fue un pienso sólido (Samyang Feed Co., Corea). Los animales de prueba se criaron bajo las mismas condiciones por 7 días, adaptados a ambientes de laboratorio y usados después para pruebas.

- 20 Se administró el abdomen de los animales de prueba (ratones blancos machos SD) con 10 ml de tioglicolato al 4%, y se proliferaron células primarias de macrófagos abdominales por 3 días y se dislocaron cervicalmente los ratones. Se recolectaron las células primarias de macrófagos abdominales de los ratones blancos machos SD preparadas mediante dislocación cervical.

- 25 Específicamente, después de añadir 10 ml de HBSS al abdomen, se recolectaron las células primarias de macrófagos abdominales usando una jeringa y se transfirieron a un tubo cónico. Se centrifugaron las células primarias de macrófagos abdominales a 13,000 rpm por 5 minutos, se lavaron con un medio DMEM dos veces, se sembraron en un plato de petri que tiene un diámetro de 60 mm y se incubaron en un incubadora celular de CO<sub>2</sub> por 4 horas. Después de la incubación, se retiraron las células flotantes y las células adheridas se estabilizaron por 24 horas, después se aislaron las proteínas de las células, que se usaron posteriormente.

- 30 Se trataron las proteínas aisladas con 50 mg/ml de las fracciones del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* obtenido en el Ejemplo 1, se estabilizaron por 30 minutos y se midió la actividad de la enzima de ciclooxigenasa usando un kit de ensayo de actividad fluorescente COX (Cayman ChemiacICompany, Ítem No. 700200). Se muestran los resultados de la actividad enzimática medida en la FIG. 12.

- 35 Como se puede ver a partir de la FIG. 12, la fracción de agua del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* no exhibió ningún efecto inhibitorio, la fracción de hexano y la fracción de butanol exhibieron baja actividad inhibitoria, mientras la fracción de acetato de etilo y la fracción de cloroformo exhibieron actividad inhibitoria considerablemente superior. En particular, la diferencia en la actividad inhibitoria fue prominente con el paso del tiempo. En particular, la fracción de acetato de etilo del *Stauntonia Hexaphylla* que exhibió la actividad inhibitoria de COX-2 más superior.

#### **Ejemplo 9: Determinación de efectos antipiréticos de extractos y fracciones**

- 40 9-1. Determinación del efecto antipirético del extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*

Se usaron los animales de prueba para determinar efectos antipiréticos del extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* y fracciones de los mismos preparadas en el Ejemplo 1.

- 45 Los animales de prueba usados aquí eran ratones blancos machos de 5 semanas de edad obtenidos de Samtako Inc. (Corea). Se criaron los ratones a una temperatura de 20°C a 24°C y a una humedad de 60% a 70% bajo la condición de iluminación día-noche en intervalos de 12 horas y se alimentaron libremente con agua y pienso. El pienso usado aquí fue un pienso sólido (Samyang Feed Co., Corea). Se criaron los animales de prueba bajo las mismas condiciones por 7 días, se adaptaron a ambientes de laboratorio y después usaron para pruebas.

- 50 Se llevó a cabo la prueba de fiebre inducida por lipopolisacarido (LPS) como una endotoxina bacteriana para determinar eficacia antipirética usando los animales de prueba usando un método sugerido por Vilela FC et. al (Anti-inflammatory and antipyretic effects of *Sonchus oleraceus* in rats. J Ethnopharmacol. 17;127(3):737-41 (2010)).

Específicamente, se seleccionaron aleatoriamente 5 ratones de los animales de prueba y se establecieron como un primer grupo, y se inyectaron de manera intraperitoneal 500 mg/kg de lipopolisacarido (LPS, Sigma, EEUU) en el ratón para inducir fiebre. Se midió de la temperatura corporal como sigue. Se midió la temperatura corporal rectal usando un termómetro rectal (Portable Thermocouple Thermometer (Physitemp Instruments, EEUU) y una sonda rectal de

acero inoxidable para ratas (Physitemp Instruments, EEUU) y se midieron las temperaturas corporales de los ratones SD tres veces antes de la prueba para minimizar un incremento de temperatura causado por tensión de medición de temperatura.

5 Primero, con el fin de determinar efectos antipiréticos del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*, se usaron un grupo de control negativo (LPS) no tratado con cualquier muestra, un primer grupo de control positivo (APAP) administrado oralmente con 50 mg/kg de acetaminofén (APAP, Sigma, EEUU), un medicamento convencional, se encontró que tenía efecto antipirético, y un segundo grupo control positivo (DexametasonA) administrado oralmente con 1 mg/kg de dexametasona (Sigma, EEUU).

10 Primero, se inyectaron de manera intraperitoneal (i.p.) 500 µg/kg de una sustancia que induce fiebre (LPS) en los animales de prueba que terminaron las preparaciones para minimización del incremento de temperatura causado por tensión de medición de temperatura, y se prepararon un grupo no tratado (LPS), un grupo (SHL-200) administrado oralmente con 200 mg/kg del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*, un grupo (APAP) administrado oralmente con 50 mg/kg de acetaminofén, y un grupo (Dexametasona) administrado oralmente con 1 mg/kg de dexametasona de acuerdo al tipo de grupos de prueba. Adicionalmente, se administraron oralmente 200 mg/kg del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* una hora después de la administración de la sustancia que induce fiebre (SHL-200 (1h)), y se midieron las temperaturas rectales en una hora, 4 horas y 8 horas sobre 8 horas en total después de la administración de la sustancia que induce fiebre. Los resultados de medición se muestran en la FIG. 12 y la siguiente Tabla 3. Los valores de la siguiente Tabla 3 indican temperaturas corporales (°C) medidas en diferentes tiempos.

20

Tabla 3

	Normal	LPS	SHL 200	SHL 200 (1h)	Dexametasona	APAP
0h	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2
1h	37.55 ± 0.21	38.2 ± 0.68	36.65± 0.69	38.23±0.41	37.3±0.52	36.58±0.67
4h	37.65 ± 0.07	37.85 ± 0.33	37.20±0.45	36.95±0.54	37.6±0.12	37.53±0.59
8h	37.55 ± 0.07	37.6 ± 0.61	37.7±0.14	37.73±0.22	37.73±0.13	37.78±0.13

25 Como se puede ver a partir de la FIG. 13 y la Tabla 3, el grupo administrado con la sustancia que induce fiebre (LPS) exhibió un fuerte incremento de aproximadamente 1°C a 1.8°C o más, desde una hora en adelante. Sin embargo, el grupo administrado con el extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* (SHL-200) de acuerdo con la presente invención exhibió una disminución notable en la temperatura corporal. Esta disminución fue mayor que aquella del grupo (Dexametasona) administrado oralmente con 1 mg/kg de dexametasona y fue sustancialmente equivalente a aquella del grupo (APAP) administrado oralmente con 50 mg/kg de acetaminofén generalmente usado como un fármaco antipirético, que demuestra que SHL-200 exhibió los efectos antipiréticos superiores. En 4 horas después de la administración, SHL-200 no exhibió un incremento en la temperatura corporal, en comparación con el grupo (APAP) administrado oralmente con 50 mg/kg de acetaminofén, que demuestra que SHL-200 también exhibió persistencia superior.

30 Adicionalmente, en caso de un grupo (SHL-200(1h)) administrado oralmente con 200 mg/kg del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* en una hora después de la administración de la sustancia que induce fiebre (LPS), la temperatura corporal se incrementó bruscamente como el grupo control y después se disminuyó considerablemente y en 4 horas, disminuyó a un nivel, similar al del grupo (APAP) administrado oralmente con la sustancia que induce fiebre y 50 mg/kg de acetaminofén, que demuestra que el extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* ejerció acciones efectivas incluso después de iniciar la fiebre, es decir, se elevó la temperatura corporal a un nivel predeterminado.

9-2. Determinación del efecto antipirético de la fracción del extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*

40 Con el fin de determinar efectos antipiréticos de la fracción del extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* preparado en el Ejemplo 1-2, se usaron animales de prueba (ratones blancos machos SD de 5 semanas de edad (Samtako Inc., Corea)) criados en la misma forma como en el Ejemplo 9-1.

45 Como en el ejemplo 9-1 para determinar eficacia antipirética usando los animales de prueba, la fiebre inducida por LPS se llevó a cabo usando una endotoxina bacteriana (Lipopolisacarido (LPS) de E. coli 0111:B4 (Sigma, EEUU)) por un método sugerido por Vilela FC et. al., y la temperatura corporal se midió usando un termómetro rectal.

Primero, con el fin de determinar los efectos antipiréticos del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*, se usaron un grupo control negativo (LPS) no administrado con ninguna muestra, y un grupo control positivo (Ibuprofeno) administrado oralmente con ibuprofeno (Daewoong Pharmaceutical Co., Ltd., Corea) como un medicamento convencional conocido por tener efectos antipiréticos. Adicionalmente, una fracción de hexano (Hx), una

fracción de cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), una fracción de acetato de etilo (EA) y una fracción de butanol (BuOH) se administraron respectivamente en una dosificación de 20 mg/kg a los grupos experimentales.

5 Primero, se midieron tres veces las temperaturas corporales rectales de los animales de prueba usando un termómetro corporal (Portable Thermocouple Thermometer, physitemp, EEUU) antes de la prueba para minimizar el incremento de temperatura causado por la tensión de medición de temperatura.

10 Los animales de prueba sometidos a mediciones de temperatura se administraron oralmente con diferentes contenidos de las respectivas muestras a los 5 minutos antes de la administración de la sustancia que induce fiebre, la endotoxina bacteriana (LPS), después de 5 minutos, se inyectaron de manera intraperitoneal (i.p.) 500 µg/kg de la endotoxina bacteriana en los animales, y se midió la temperatura corporal rectal de los animales de prueba en intervalos de 30 minutos por 2 horas. Los resultados medidos se muestran en la FIG. 14.

15 Como se puede ver a partir de la FIG. 14, el grupo normal (Normal) no administrado con ninguna muestra exhibió casi ninguna variación en la temperatura, pero el grupo administrado con la sustancia que induce fiebre (LPS) mostró un fuerte incremento en la temperatura corporal de 1°C o más desde 30 minutos en adelante después de la administración, mantuvo la temperatura corporal aumentada aproximadamente 1°C incluso en una hora, y exhibió un incremento en la temperatura corporal de aproximadamente 0.5°C incluso en 2 horas. Entre tanto, el grupo administrado con la fracción de hexano del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* tuvo un incremento de temperatura pequeño, pero exhibió una temperatura final más bien alta a las 2 horas, en comparación con el grupo administrado con la sustancia que induce fiebre. La fracción de butanol exhibió un pequeño incremento de temperatura y un efecto de incremento de temperatura corporal total bajo, en comparación con la fracción de hexano. Entre tanto, el grupo administrado con la fracción de cloroformo exhibió un incremento en la temperatura corporal en una etapa temprana, pero retornó a una temperatura corporal normal sustancialmente en 2 horas, que demostró que el grupo administrado con la fracción de cloroformo exhibió efecto inhibitorio en el incremento de la temperatura corporal, es decir, efecto antipirético. La temperatura corporal de la fracción de acetato de etilo retornó a una temperatura corporal normal en 1 hora, pero fue más baja que una temperatura inicial en 2 horas. Esto demuestra que la fracción de acetato de etilo exhibió un efecto antipirético notablemente superior comparable al ibuprofeno generalmente usado como un fármaco antipirético y demostró tener efectos antipiréticos.

Aunque las realizaciones preferidas de la presente invención se han divulgado con fines ilustrativos, los expertos en la técnica apreciarán que son posibles diversas modificaciones, adiciones y sustituciones, sin apartarse del alcance y espíritu de la invención como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición antiinflamatoria que comprende un extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* como un ingrediente activo.
- 5 2. La composición antiinflamatoria de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* se obtiene extrayendo hojas de *Stauntonia Hexaphylla* con, como solvente de extracción, al menos uno seleccionado del grupo que consiste en agua, alcoholes que tienen de 1 a 5 átomos de carbono y mezclas de los mismos.
3. La composición antiinflamatoria de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* es un extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla*.
- 10 4. La composición antiinflamatoria de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el extracto en agua caliente de la hoja de *Stauntonia Hexaphylla* es una fracción obtenida fraccionando el extracto en agua caliente de la hoja de *Stauntonia Hexaphylla* con acetato de etilo o cloroformo como solvente de fraccionamiento.
5. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y prevención de una enfermedad inflamatoria que comprende un extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* como ingrediente activo.
- 15 6. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* es una fracción obtenida fraccionando un extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* con acetato de etilo o cloroformo como solvente de fraccionamiento.
7. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la enfermedad inflamatoria comprende uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en dermatitis, dermatomiositis, polimiositis, alergias, lupus eritematoso sistémico, pénfigo, estomatitis aftosa, retinitis, gastritis, hepatitis, bronquitis, esofagitis, colitis, pancreatitis, colitis, nefritis, decúbito, lupus, tiroiditis crónica, esclerosis múltiple, sepsis, lesión por radiación, rechazo de trasplante de órganos, edema generalizado y edema localizado.
- 20 8. Una composición cosmética para mitigar o aliviar la inflamación que comprende un extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* como ingrediente activo.
- 25 9. La composición cosmética de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* es una fracción obtenida fraccionando un extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* con acetato de etilo o cloroformo como solvente de fraccionamiento.
10. Una composición antipirética que comprende un extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* como ingrediente activo.
- 30 11. La composición antipirética de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* se obtiene extrayendo hojas de *Stauntonia Hexaphylla* con, como solvente de extracción, al menos uno seleccionado del grupo que consiste en agua, alcoholes que tienen de 1 a 5 átomos de carbono y mezclas de los mismos.
- 35 12. La composición antipirética de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el extracto de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* es una fracción obtenida fraccionando un extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia Hexaphylla* con cloroformo, butanol o acetato de etilo como solvente de fraccionamiento.
13. La composición antipirética de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el solvente de fraccionamiento es acetato de etilo o cloroformo, preferiblemente acetato de etilo.
- 40 14. La composición antipirética de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el solvente de fraccionamiento es acetato de etilo.

FIG. 1

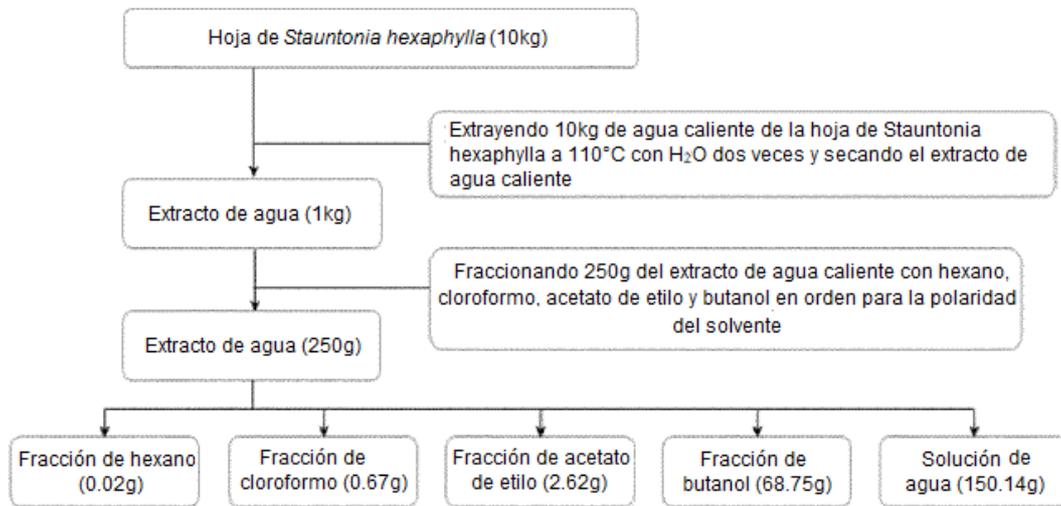


FIG. 2

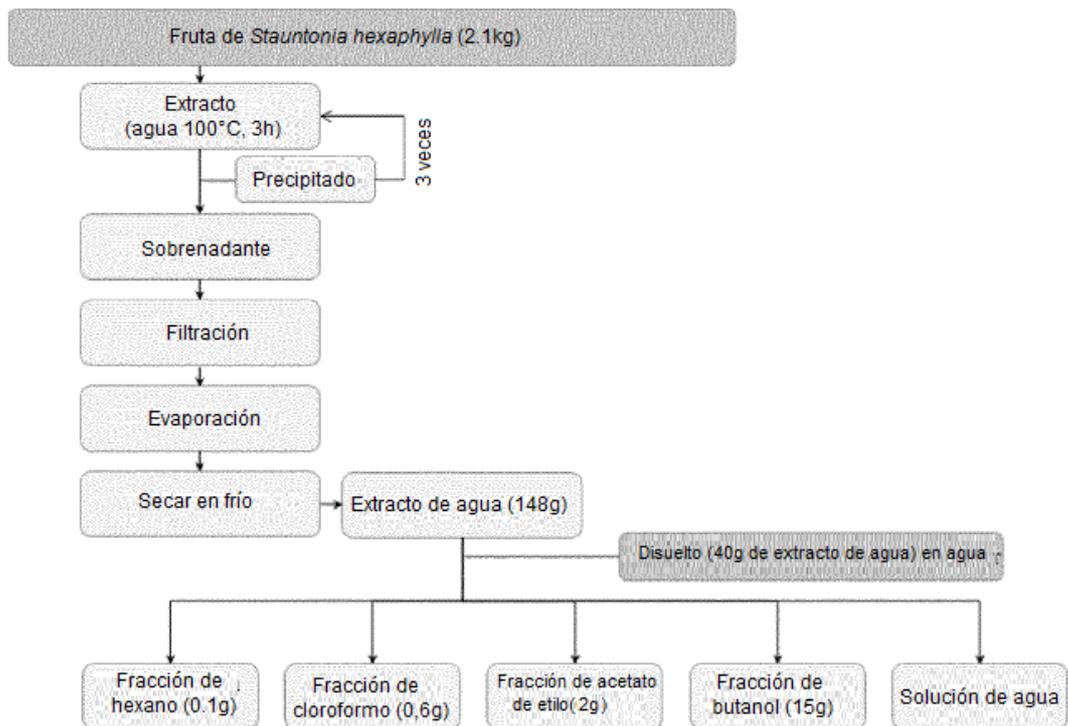


FIG. 3

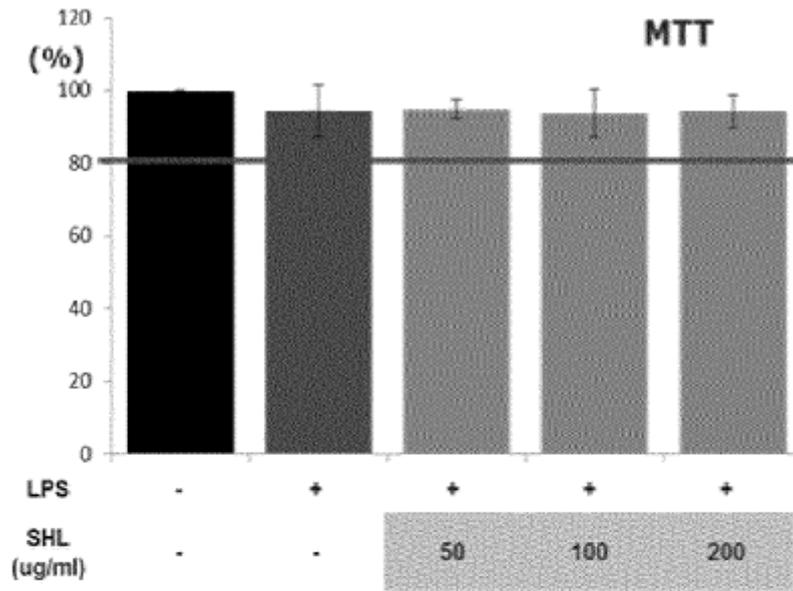


FIG. 4

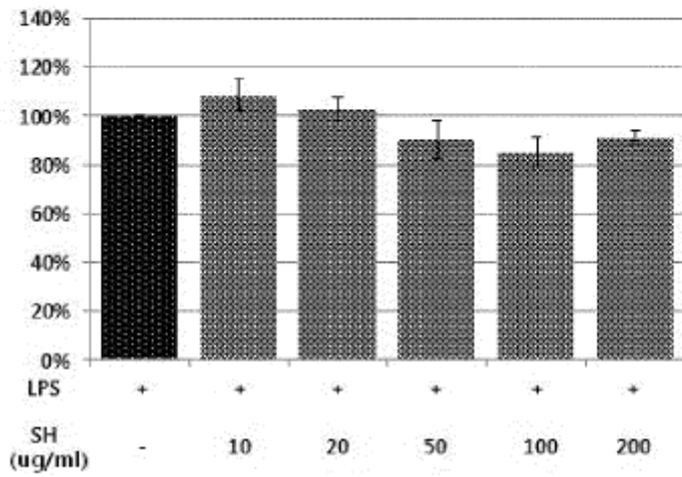


FIG. 5

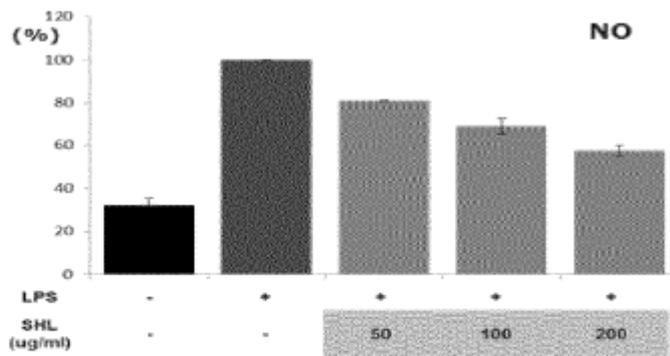


FIG. 6

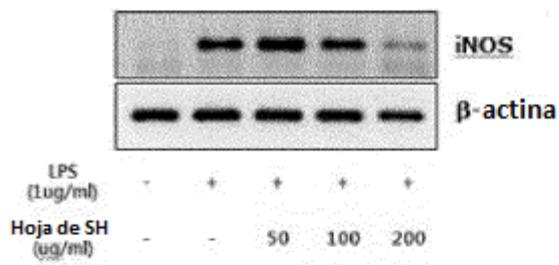


FIG. 7

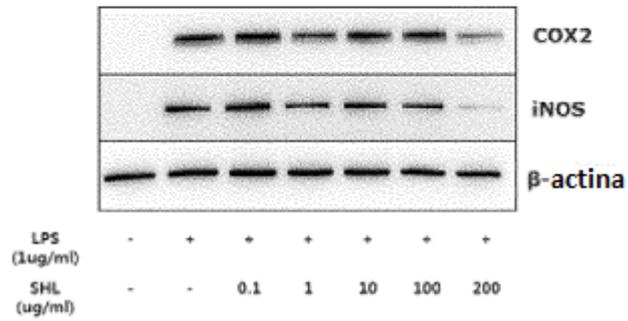


FIG. 8

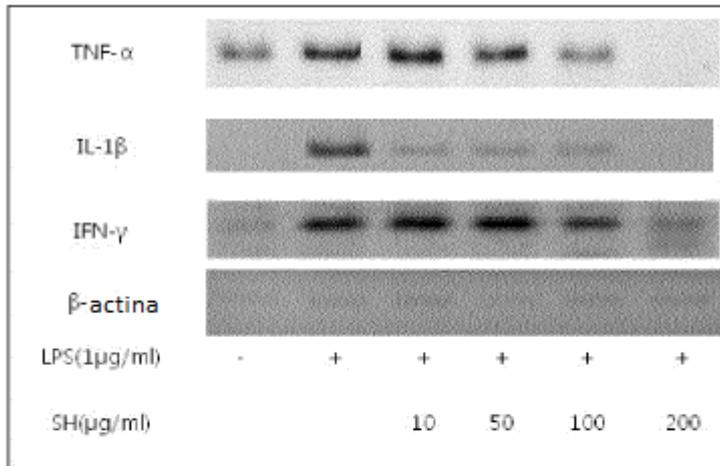


FIG. 9

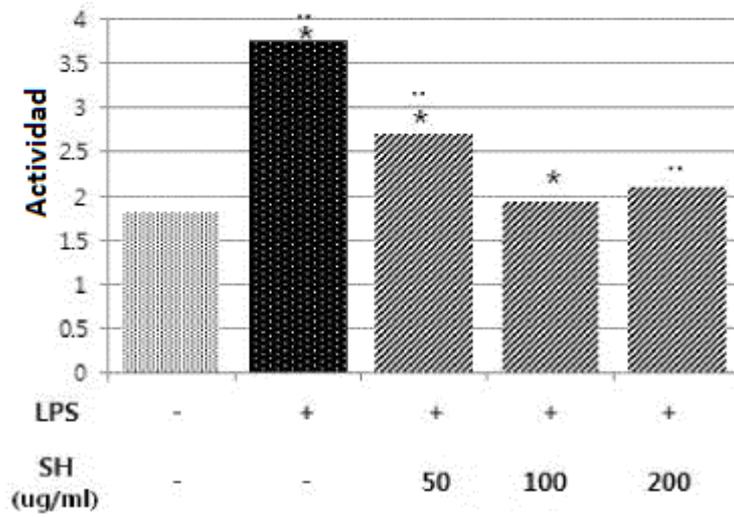


FIG. 10

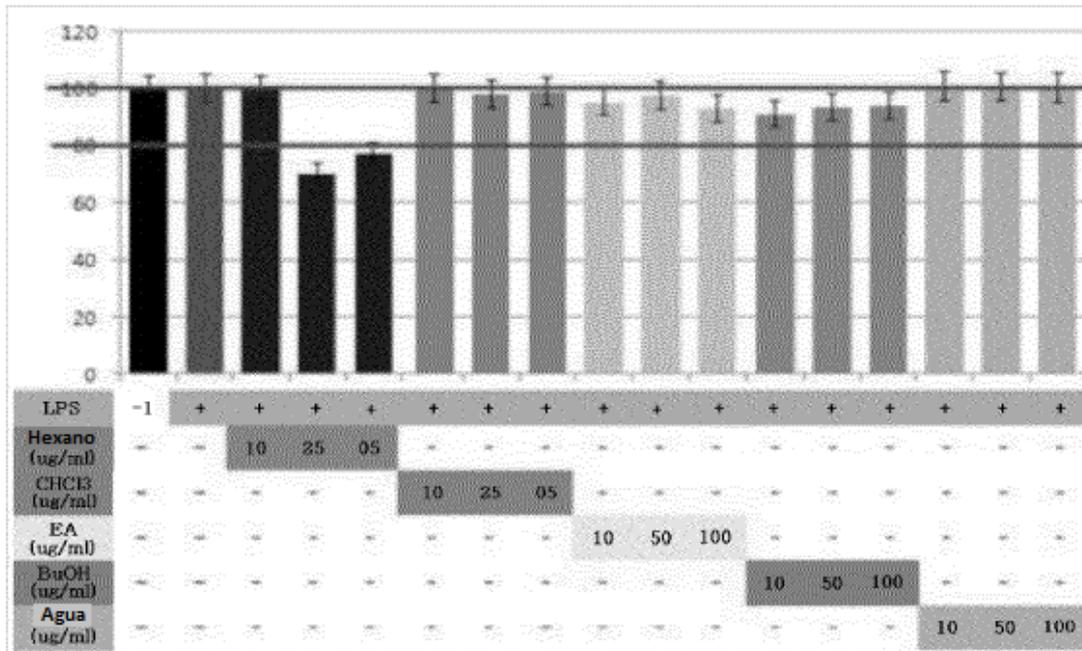


FIG. 11

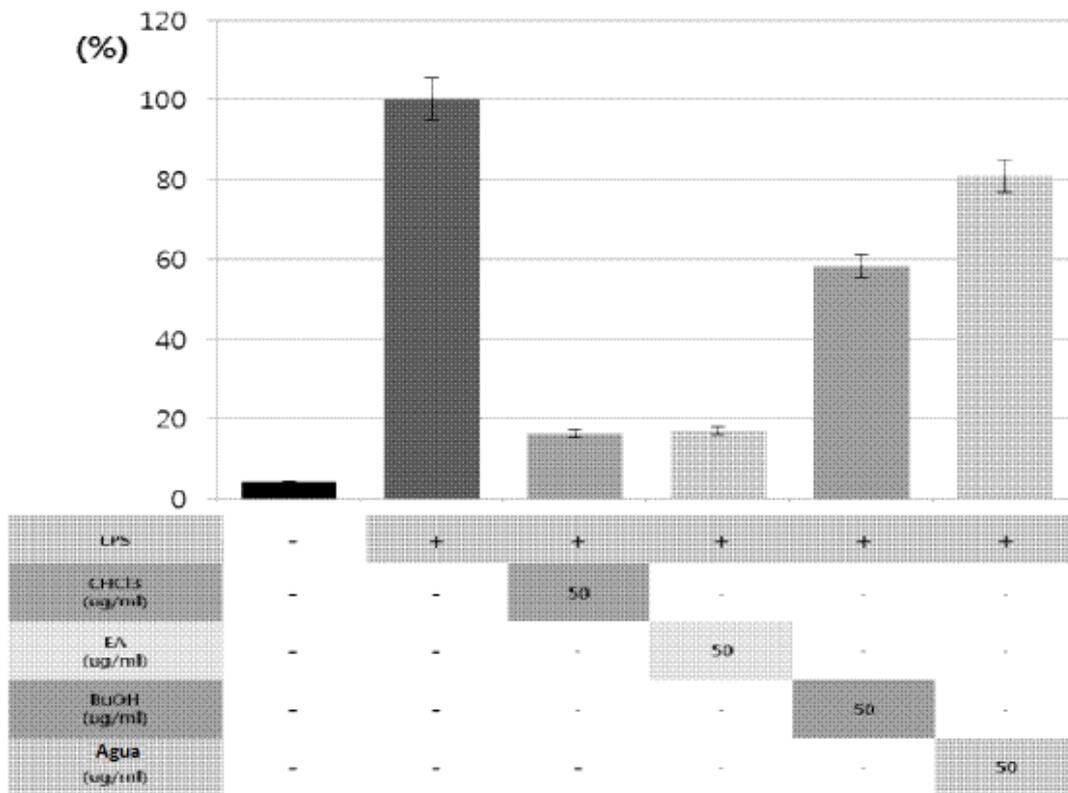


FIG. 12

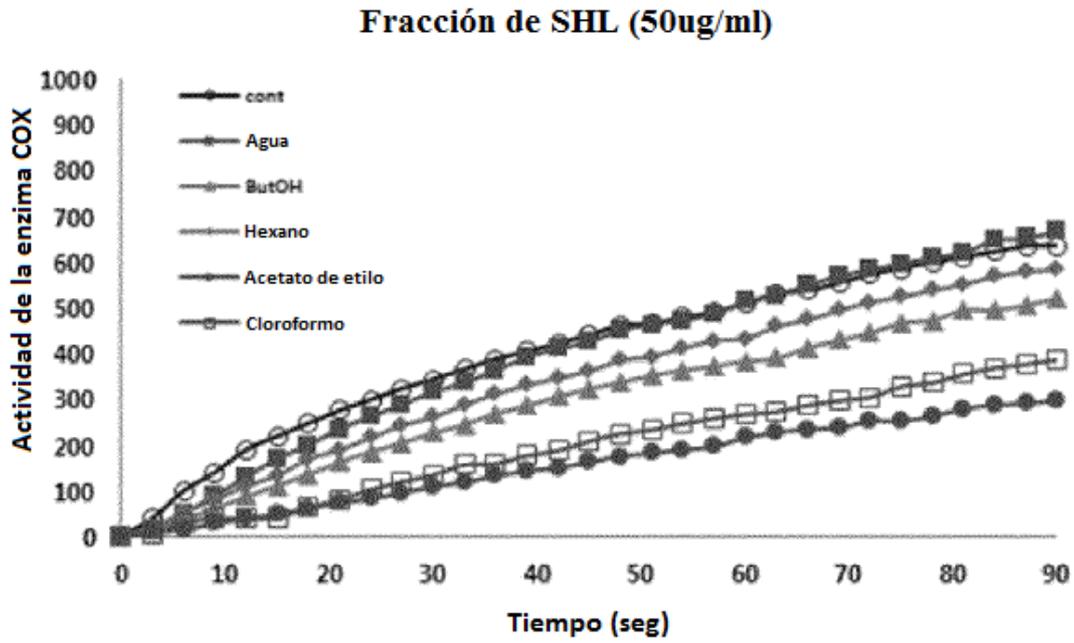


FIG. 13

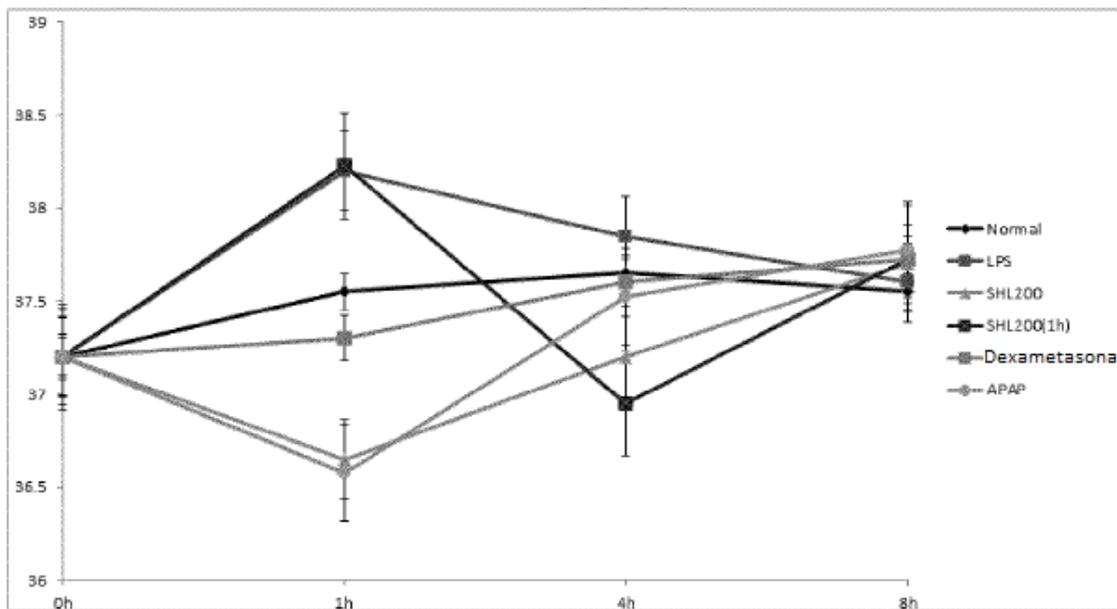


FIG. 14

