



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 295 482**

51 Int. Cl.:
A61K 36/185 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03007490 .0**
86 Fecha de presentación : **23.06.1995**
87 Número de publicación de la solicitud: **1331007**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2003**

54 Título: **Extracto de plantas chinas.**

30 Prioridad: **24.06.1994 GB 9412755**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

73 Titular/es: **PHYTOTECH LIMITED**
Corpus Christi House, 9 West Street
Godmanchester, Cambridge PE29 2HY, GB

72 Inventor/es: **Whittle, Brian Anthony;**
Latchman, Yvette y
Brostoff, Jonathan

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Extracto de plantas chinas.

5 La presente invención se refiere a materiales derivados a partir de hierbas chinas tradicionales y a composiciones farmacéuticas que las contienen que son útiles en el tratamiento de enfermedades atópicas, en particular eczema atópico, y en el tratamiento de otros desórdenes de la piel, tal como eczema no atópico y psoriasis.

10 Debe entenderse que por el término hierba china se quiere significar cualquier hierba utilizada por practicantes de medicina tradicional, habitualmente, pero no exclusivamente, por chinos.

15 Los practicantes de la medicina tradicional china tratan las enfermedades utilizando un sistema de anatomía y diagnóstico totalmente diferente del utilizado en Occidente. Los remedios recetados son habitualmente una pluralidad de hierbas chinas que se preparan para su administración por el método tradicional de decocción, es decir, hirviendo las hierbas en agua. Las hierbas se retiran y el agua se retiene para su administración oral, parenteral o tópica al paciente, según sea lo apropiado.

20 Las recetas para su utilización en este tipo de terapia pueden exigir la utilización en combinación de diez o más hierbas y la medicina tradicional china enseña que todas las hierbas son necesarias para conseguir una receta equilibrada. Una receta se percibe como un todo equilibrado que contiene la jerarquía de hierbas a las que se atribuye diferentes funciones en el tratamiento de diferentes manifestaciones y síntomas de la enfermedad.

25 La identificación de hierbas con una actividad clínica aceptable para cualquier enfermedad humana particular, y simultáneamente de baja toxicidad, se ha realizado mediante observación y ensayo y error a lo largo de muchos años. En algunos casos, las recetas de hierbas tradicionales chinas pueden tratar eficazmente enfermedades que no son bien tratadas por monoterapias occidentales.

30 Son enfermedades que aparentemente responden a la utilización de una pluralidad de hierbas chinas aquéllas en las que hay una causalidad poco clara y compleja. Un ejemplo particular es el eczema atópico, en el que existe inflamación crónica de la piel que es iniciada y mantenida por un número de mediadores diferentes, de los cuales sólo se conocen algunos. Algunos se relacionan con reacciones antígeno-anticuerpo. De otros muchos otros se sospecha pero no han sido definidos todavía. Los agentes terapéuticos individuales, tal como los fármacos antiinflamatorios no esteroideos que interactúan con mediadores inflamatorios específicos, tal como las prostaglandinas, son ineficaces en el eczema atópico severo. Por otra parte, los corticosteroides tienen múltiples acciones farmacodinámicas y son efectivos en el eczema. Parece ser, por lo tanto, que el tratamiento del eczema atópico severo requiere el ataque simultáneo sobre un número de lesiones patológicas, probablemente relacionadas con el proceso inmunológico en células y líquidos corporales. Mientras que los corticosteroides y algunos supresores inmunológicos tienen el amplio abanico de actividad requerido para tal ataque, su uso está limitado debido a su toxicidad. Los remedios herbales de la medicina tradicional china que se conocen para el tratamiento del eczema parecería que poseen la actividad necesaria de los corticosteroides y supresores inmunológicos pero sin su toxicidad.

40 Se ha utilizado una receta de las hierbas chinas con una hierba seleccionada de cada una de las hierbas siguientes y sus equivalentes Pin yin, o designadas por su denominación en *Materia medica*: *Radix Ledebouriella*, *Fructus Tribuli*, *Herba Potentilla Chinensis*, *Caulis Clematis Armandii*, *Radix Rehmannia*, *Radix Glycyrrhiza*, *Radix Paeonia Rubra*, *Cortex Dictamnii Radicis*, *Herba Lopatheri* y *Spika Schizonepetae*, para el tratamiento efectivo del eczema atópico y la psoriasis. La eficacia clínica de tal prescripción en niños con eczema atópico ha sido descrita por Sheehan *et al.*, en *British Journal of Dermatology* (1992) 126: páginas 179-184, y en adultos, nuevamente por Sheehan *et al.*, en *The Lancet* (1992) 4 de julio, páginas 13-17. Un método particular de preparación de un extracto de esas mismas 10 hierbas para su utilización en el tratamiento del eczema atópico y otras enfermedades inflamatorias de la piel se describe en la patente GB-A-2254783.

55 Mientras que una decocción de las 10 hierbas anteriormente mencionadas se conoce que es eficaz, la utilización de una receta compleja que contiene una pluralidad de hierbas es cara y, por lo tanto, es deseable simplificar la receta si esto resulta posible sin comprometer la actividad y/o seguridad. También sería preferible limitar cualquier receta a hierbas que puedan cultivarse en el Reino Unido o en Europa, antes bien que depender de su importación desde China. De esta manera, se han realizado muchos intentos de identificar el principio o principios activos en las recetas de medicinas tradicionales chinas. En el caso del eczema, sin embargo, esto ha demostrado ser difícil porque, hasta el momento, no ha existido ningún modelo animal o *in vitro* validado para la enfermedad que pudiera utilizarse para identificar la actividad clínica en fracciones o sustancias puras preparadas a partir de hierbas crudas.

60 Ahora, sin embargo, se ha desarrollado un ensayo *in vitro* que parece ser predictivo de eficacia clínica en el eczema atópico y otras enfermedades atópicas, y esto ha permitido a los presentes inventores detectar componentes activos en decocciones liofilizadas (a continuación en este documento referidas como PSE222) de las 10 hierbas citadas anteriormente.

65 Aunque la sabiduría tradicional china dicta que se requiere una pluralidad de hierbas, la utilización de este método *in vitro* y la confirmación mediante experimentos clínicos *in vivo* ha demostrado que el efecto clínico deseado puede reproducirse mediante un subconjunto de las 10 hierbas y por componentes individuales dentro de éste. Además, el

método ha permitido también identificar componentes en PSE222 que pueden iniciar el empeoramiento de la condición atópica y que es deseable eliminar de cualquier extracto para uso farmacéutico.

El ensayo *in vitro* de eficacia se basa en la observación de que en la enfermedad atópica y, en particular, en el eczema atópico, las células de la piel y los monocitos sanguíneos periféricos en el hombre, expresan un antígeno marcador celular de superficie CD23, y que la expresión de CD23 se ve inhibida o reducida con el tratamiento exitoso del eczema (ver Takigawa *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.* (1991) 84:páginas 275-282). La expresión de CD23 puede inducirse también *in vitro* en monocitos humanos mediante la exposición a la citoquina interleuquina 4 (IL4) y, en paralelo, con la situación *in vivo* descrita por Takigawa anteriormente, la inducción es inhibida por compuestos que se conoce que son útiles en la enfermedad atópica. Estas observaciones, por lo tanto, proporcionan la base para un ensayo *in vitro* sencillo en el que monocitos preparados a partir de sangre periférica humana se ponen en contacto, simultáneamente, con IL4 y con el agente activo a ensayo. Se mide la cantidad de expresión de CD23 utilizando anticuerpos monoclonales contra CD23 marcados, y cualquier efecto se expresa como porcentaje de inhibición de la expresión de CD23 respecto a un control, en el que se sustituye el material de ensayo por solución salina o preparación placebo de hierbas. El hecho de que esta inhibición significativa de la expresión de CD23 en este ensayo *in vitro* sea predictivo de eficacia clínica queda demostrado por el hecho de que el extracto PSE222, preparado a partir de las 10 hierbas citadas anteriormente y que han sido utilizadas con éxito clínicamente para el eczema atópico, muestra una inhibición de la expresión de CD23 en el ensayo del 50 al 60%.

Mediante la utilización del ensayo anterior, los presentes inventores han identificado componentes en PSE222 adecuados para su uso clínico en enfermedades atópicas en general, y también en el tratamiento de enfermedades particulares de la piel, tal como el eczema no atópico y la psoriasis.

Por ejemplo, los presentes inventores han identificado un material adecuado para el tratamiento de enfermedades atópicas, eczema no atópico o psoriasis, que puede extraerse a partir de una decocción liofilizada de una mezcla que comprende las siguientes hierbas chinas:

Radix Ledebouriella

Fructus Tribuli

Herba Potentilla Chinensis

Caulis Clematis Armandii

Radix Rehmannia

Radix Glycyrrhiza

Radix Paeonia Rubra

Cortex Dictamni Radicis

Herba Lopatheri

Spika Schizonepetae

comprendiendo dicho material uno o más de aquellos componentes presentes en la decocción liofilizada que operó con valores de Rf en los intervalos comprendidos entre 0,00 y 0,100, entre 0,167 y 0,300, entre 0,400 y 0,533, entre 0,700 y 0,833, ó entre 0,900 y 0,967, si dicha decocción liofilizada se diluye en solución acuosa y se somete a cromatografía en una tira de celulosa 3MM Whatman de 2 cm x 55 cm durante 10 horas utilizando una mezcla de disolventes de butanol, etanol y agua en proporciones 4:1:1.

Preferentemente, dicho material comprende uno o más de aquellos componentes presentes en la decocción liofilizada que corrió con valores de Rf en el intervalo comprendido entre 0,00 y 0,100.

Al someter a la tira de celulosa a una extracción con agua después de operar el frente de disolvente unos 30 cm, aquellos componentes extraídos con agua de valores de Rf aproximadamente en los intervalos proporcionados anteriormente, causan una reducción significativa del antígeno CD23 en monocitos humanos tratados *in vitro* con IL4. Si a continuación se extrae la tira de celulosa con metanol, los extractos de metanol de aquellos componentes con valores de Rf aproximadamente en los intervalos 0,700 a 0,833 ó 0,900 a 0,967 también causan una reducción significativa en la expresión de CD23 *in vitro*.

Además, y sorprendentemente, tras una extracción con agua, y posterior extracción con metanol de la tira de celulosa, aquellos extractos de metanol de componentes que corrían con valores de Rf en los intervalos 0,067 a 0,333 y 0,533 a 0,700 cuando se ensayaron en el ensayo CD23, potenciaron o incrementaron la expresión del antígeno CD23 en comparación con los controles. La presencia de la actividad "potenciadora" en cualquier preparación para el tratamiento de eczema atópico o no atópico, u otra enfermedad atópica, es claramente no deseable, y de esta manera,

se espera una mejor actividad clínica tras su eliminación. Puede eliminarse una cantidad significativa de la actividad “potenciadora” mediante la extracción de PSE222, u otra preparación de las 10 hierbas citadas anteriormente, con un disolvente no polar tal como hexano.

Por lo tanto, los presentes inventores han identificado asimismo un material para el tratamiento del eczema atópico, eczema no atópico o psoriasis, que comprende una decocción o extracto de una mezcla que incluye las diez hierbas chinas citadas anteriormente, del que se han eliminado aquellos componentes que son extraíbles con hexano u otro disolvente no polar. Una decocción o extracto tratado de esta manera demuestra una inhibición significativa de la expresión de CD23 en monocitos humanos en el ensayo *in vitro* anteriormente descrito que es indicativo de potencial eficacia clínica.

Se ha ensayado la capacidad de inhibir la expresión *in vitro* de CD23 de decocciones de las hierbas individuales de la lista anterior de diez hierbas, y esto ha conducido a la identificación de un subconjunto de hierbas que se predice que tienen elevada eficacia clínica.

Por lo tanto, los presentes inventores han identificado asimismo un material para el tratamiento de las enfermedades atópicas, eczema no atópico o psoriasis que comprende una decocción o extracto de uno o más de los siguientes conjuntos de hierbas chinas:

(a)

Radix Paeonia Rubra

Radix Glycyrrhiza

Radix Rehmannia

(b)

Cortex Dictamni

Radix Paeonia Rubra

Radix Glycyrrhiza

Radix Rehmannia

Radix Ledebouriella

Fructus Tribuli

ó

(c)

Radix Paeonia Rubra

Radix Glycyrrhiza

Spika Schizonepetae

en ausencia sustancial de cualquier otra hierba china. Tal decocción o extracto se trata de manera que se eliminen aquellos componentes extraíbles con hexano o con otros disolventes no polares. Los conjuntos de hierbas especificados anteriormente bajo (a) y (c) tienen la ventaja de que todas las hierbas utilizadas pueden cultivarse en Europa.

En un primer aspecto la presente invención proporciona así un material adecuado para el tratamiento de las enfermedades atópicas, eczema no atópico y psoriasis que comprende una decocción o extracto realizados a partir de las hierbas siguientes

Radix Paeonia Rubra

Radix Glycyrrhiza

Radix Rehmannia

en ausencia sustancial de cualquier otra hierba.

El material puede, por ejemplo, comprender decocciones o extractos individuales de las hierbas.

Dichos extractos o decocciones pueden someterse opcionalmente a extracción con un disolvente no polar tal como el hexano.

En un segundo aspecto la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad atópica, el eczema no atópico o la psoriasis, que comprende el material según el primer aspecto de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un tercer aspecto la presente invención proporciona la utilización de un material según el primer aspecto de la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad atópica, el eczema no atópico o la psoriasis.

La producción de componentes activos de PSE222 a escala comercial puede conseguirse mediante la puesta en contacto de una decocción liofilizada y celulosa fibrosa, disponible comercialmente en los grados adecuados, seguido de la mezcla con un disolvente adecuado tal como mezcla butanol/etanol/agua, como se ha descrito anteriormente, o mezcla butanol/IMS/agua en las proporciones 4:1:1, con el fin de eliminar los materiales volúmenes e inactivos. A continuación, la centrifugación de la mezcla rinde un precipitado que puede ser extraído nuevamente con la mezcla anterior de disolventes previamente a su desecación y mezcla con agua con el fin de extraer los componentes activos para su formulación como preparaciones farmacéuticas.

Los materiales del primer, segundo, tercer y cuarto aspecto de la invención, producidos o no mediante el proceso comercial anteriormente descrito, se preparan preferentemente como composiciones farmacéuticas mediante la mezcla con cualquier portador o diluyente farmacéutico adecuado, de los que se conocen gran cantidad en la técnica. Pueden formularse composiciones adecuadas para el tratamiento de enfermedades atópicas en general, y en particular eczema atópico o para eczema no atópico o soriaris, para su administración oral, tópica o parenteral. Pueden prepararse formulaciones orales en formas de dosificación unitaria como, por ejemplo, tabletas, en polvo o en gránulos, o como preparación líquida para beber.

Se apreciará que el ensayo *in vitro* descrito anteriormente puede ser utilizado como indicador de probable actividad clínica de cualquier compuesto o preparación contra el eczema atópico o dermatitis, sin importar origen geográfico o botánico.

Los ejemplos siguientes utilizan un procedimiento para indicar la actividad clínica de un compuesto o preparación contra el eczema atópico o dermatitis que comprende las etapas siguientes:

a) incubar los monocitos de la sangre periférica *in vitro* simultánea o secuencialmente con interleuquina 4 (IL4) y el compuesto o preparación cuya actividad debe analizarse,

b) medir la expresión del marcador de superficie celular CD23 en dichos monocitos y

c) utilizar las mediciones obtenidas en la etapa b) como una indicación de la eficacia clínica potencial del compuesto o preparación contra el eczema atópico o dermatitis mediante la comparación del nivel de la expresión de CD23 inducida por IL4 de los monocitos en presencia o ausencia de dicho compuesto o preparación.

Una inhibición de la expresión de CD23 superior al 25% es estadísticamente significativa e indica un compuesto o preparación que puede resultar de utilidad clínicamente.

A continuación, se describe la invención con referencia a los Ejemplos y dibujos siguientes, en los que:

La figura 1a es un gráfico del porcentaje de CD14+23+monocitos frente a la concentración de material a ensayo utilizado en el ensayo para PSE222 (●), y para una mezcla de hierbas de placebo (○) utilizando monocitos de pacientes con eczema atópico.

La figura 1b muestra los mismos datos que la figura 1a, representados en un histograma con porcentaje de inhibición de la expresión de CD23 en el eje y. Los bloques con entramado representan los datos de PSE222, y los bloques vacíos, los del control con placebo.

La figura 1c es un gráfico como el de la figura 1a, que muestra el efecto de PSE222 sobre la expresión de CD23 en monocitos de individuos normales.

La figura 1d muestra los mismos datos que en la figura 1c, en forma de histograma, como en la figura 1b.

La figura 2 muestra el porcentaje de inhibición de la expresión de CD23 en monocitos humanos *in vitro* para cada una de las 30 fracciones extraídas con agua en una tira de cromatografía en celulosa.

La figura 3 muestra el porcentaje de inhibición de la expresión de CD23 en monocitos humanos *in vitro* para cada una de las 30 fracciones extraídas con metanol en una tira de cromatografía en celulosa, y

ES 2 295 482 T3

La figura 4 muestra el efecto sobre la expresión *in vitro* de CD23 de la extracción con hexano de PSE222.

En los ejemplos:

5 El ejemplo 1 es una descripción de la preparación de un extracto liofilizado del conjunto completo de las diez hierbas (al que se hace referencia como PSE222);

10 el ejemplo 2 muestra la actividad clínica del material de la presente invención (“d, e, f”) en comparación con el material de la técnica anterior (“a” o “PSE222”) y los materiales preparados de manera correspondiente a partir de los otros subconjuntos de hierbas (“e” y “c, d, e, f, g, h” y “d, e, k”, haciendo referencia las letras a los materiales de la Tabla I);

15 los ejemplos 3, 4 y 5 son ejemplos de comparación que muestran la actividad clínica de las fracciones obtenidas a partir de PSE222.

Ejemplo 1

(Comparación)

20 Se sometieron a ebullición lenta un peso total de 38,8 g de las hierbas siguientes durante una hora y media en 300 ml de agua:

Radix Ledebouriella

25 *Fructus Tribuli*

Herba Potentilla Chinensis

Caulis Clematidis Armandii

30 *Radix Rehmannia*

Radix Glycyrrhiza

35 *Radix Paeonia Rubra*

Cortex Dictamnina Radicis

40 *Herba Lopatheri*

Spika Schizonepetae

Se retiraron las hierbas, se concentró la decocción hasta un volumen final de 50 ml mediante ebullición, y a continuación, se liofilizó. En el extracto liofilizado PSE222, un gramo de extracto seco contenía la extracción en agua de, aproximadamente, 5 gramos de hierba.

Se preparó una decocción de hierbas “placebo”, sin eficacia conocida contra el eczema atópico, de la misma manera que la descrita anteriormente.

50 Se examinaron las actividades de PSE222 y de la decocción placebo, en el ensayo de inhibición de CD23 llevado a cabo como se describe posteriormente.

Se recogió sangre de un voluntario y se le añadió heparina, y se separó en un gradiente de Ficoll para aislar las células mononucleares periféricas de la sangre (monocitos). A continuación, se cultivaron los monocitos durante la noche en RPMI con IL4, y con adición y sin adición de PSE222 o de preparación placebo. A continuación, se lavaron los monocitos y se tiñeron doblemente utilizando anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína contra antígenos de monocito CD14 y CD23. CD14 es un marcador útil que, cuando se encuentra presente, confirma la presencia de monocitos. Se midió el nivel de fluoresceína utilizando citometría de flujo (FACScan), proporcionando una indicación del nivel de expresión de CD23 de los monocitos.

60 Se muestran los resultados en las figuras 1a a 1d. Como resulta aparente de las figuras 1a y 1c, PSE222 inhibió la expresión de CD23 inducida por IL4 en monocitos procedentes de pacientes con eczema atópico (1a) al igual que en individuos normales (1c). Además, el efecto era dosis-dependiente y había una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,001$) entre el tratamiento PSE222 y el tratamiento con placebo. Las figuras 1b y 1d confirman que se dio una inhibición estadísticamente significativa de CD23 de, aproximadamente, 25 a 30% a concentraciones de PSE222 de solo 0,125 mg/ml en monocitos procedentes de pacientes con eczema atópico. En el caso de monocitos de pacientes normales, no se dio una inhibición estadísticamente significativa hasta que una concentración de PSE222 de, aproximadamente, 0,25 mg/ml.

Sobre la base de los resultados anteriores, se utilizó una inhibición en porcentaje de expresión de CD23 comprendida entre 25 y 30% como criterio de evaluación y predicción de actividad clínica para preparaciones alternativas a ensayo. En estudios clínicos llevados a cabo en pacientes con eczema atópico severo se ha demostrado que la formulación PSE222, pero no la preparación placebo, produce una reducción de 60-80% en la severidad del eczema en dos tercios a tres cuartos de los pacientes. Este resultado es estadísticamente significativo ($P=0,01$).

Ejemplo 2

Se preparó una decocción de las hierbas individuales citadas en la Tabla I posterior, mediante el método descrito en el Ejemplo 1, y se preparó un extracto seco de cada hierba. Se ensayaron cantidades de 1 mg de cada extracto (equivalente a 5 mg de hierba cruda y diluida hasta una concentración equivalente a la de la preparación PSE222) para la inhibición *in vitro* de la expresión de CD23, también como se describe en el Ejemplo 1. Se muestran los resultados en la Tabla I posterior. Cada valor que se proporciona representa la media de 5 experimentos.

TABLA I

Concentración (mg/ml)		Hierba/Constituyente	% Inhibición de CD23/CD14
		IL4 (control, línea base)	0
1	(a)	IL4 + PSE222	55,8
1	(b)	IL4 + Hierbas Placebo	3,4
0,12	(c)	<i>Cortex Dictamni</i>	43,6
0,11	(d)	<i>Radix Paeonia rubra</i>	48,0
0,05	(e)	<i>Radix Glycyrrhiza</i>	47,0
0,30	(f)	<i>Radix Rehmannia</i>	20,5
0,07	(g)	<i>Radix Ledebouriella</i>	3,0
0,06	(h)	<i>Fructus Tribuli</i>	4,6
0,08	(i)	<i>Potentilla Chinensis</i>	6,6
0,03	(j)	<i>Clematis Armandii</i>	16,0
0,04	(k)	<i>Spika Schizonepetae</i>	43,6
0,15	(l)	<i>Herba Lopatheri</i>	16,6

También se ensayó la eficacia clínica de ciertos subconjuntos de las hierbas (c) a (l) citadas en la Tabla I anterior, y los resultados se muestran en la Tabla II.

TABLA II

Subconjunto de Hierbas	Actividad Clínica	Significancia Estadística
a(PSE222)	++++	$P<0,01$
e	$\pm$	
d,e,f	+++	
c,d,e,f,g,h	++	$P<0,05$
d,e,k	+++	$P<0,05$
Clave	++++ Reducción del 70% en puntuación total del eczema +++ Reducción del 60-70% en puntuación total del eczema ++ Reducción del 60% en puntuación total del eczema $\pm$ Sin mejora consistente	

Para la hierba (e), *Radix Glycyrrhiza*, se conoce un componente que tiene alguna actividad clínica cuando se aplica localmente, pero no puede administrarse sola en dosis elevadas oralmente debido a efectos adversos similares a los de los esteroides, por ejemplo, perturba el equilibrio electrolítico.

Los resultados proporcionados en las Tablas I y II confirman que la inhibición *in vitro* de CD23 es, en gran medida, predictiva de la eficacia clínica en el eczema atópico.

Ejemplo 3

(Comparación)

5 Se añadieron 75 mg de PSE222 a medio de incubación RPMI 1640 y enrasó a un volumen de 10 ml, se incubó a 37°C con agitación ocasional y se centrifugó para retirar los finos y otros restos. Se cargaron 500 µl de una dilución 1:10 de la solución resultante en una tira de celulosa Whatman 3MM de 2 cm x 55 cm. El extremo cargado de la tira se colocó en una mezcla de butanol/etanol/agua en proporciones 4:1:1 y se permitió que el disolvente ascendiese por capilaridad durante 10 horas, tras las cuales el frente de disolvente se había desplazado, aproximadamente, 30 cm.

10 Se dejó secar la tira durante una noche y, a continuación, se cortó en trozos de 2 x 1 cm. Estos trozos se eluyeron separadamente con 20 µl/cm² de agua, y el eluido se evaporó a sequedad y se resuspendió en 500 µl de medio de incubación RPMI 1640 para el ensayo de CD23. En total, se prepararon 29 fracciones, y la figura 2 muestra la actividad inhibitoria de CD23 de cada uno, así como la de el PSE222 entero y de las hierbas placebo. La tira 30, operaspondiente al frente de disolvente, se utilizó como control interno en el ensayo de expresión de CD23.

15 Como puede observarse en la figura 2, se encontraron picos de actividad inhibitoria, particularmente en la fracción A0 (origen) y, a continuación, en las fracciones 1, 3, 6, 7, 8, 14, 15, 21, 25 y 29, correspondiendo los números de cada fracción a los centímetros recorridos desde el origen. Estas fracciones corresponden a los valores de Rf 0,00, 0,033, 0,100, 0,200, 0,233, 0,267, 0,467, 0,500, 0,900, 0,833 y 0,967, respectivamente.

20 Tras eluir los trozos de 2 x 1 cm con agua, y someter al eluido a ensayo como se ha descrito anteriormente, se secaron los trozos y, a continuación, se eluyeron con 20 µl/cm² de metanol. Nuevamente, el eluido se evaporó a sequedad y se resuspendió en 500 µl de medio de incubación RPMI 1640 para el ensayo de CD23. El nivel de actividad inhibitoria de CD23 en cada fracción tras la extracción con metanol se muestra en la figura 3. Se observaron picos separados de actividad inhibitoria en 25, 27 y 29, correspondientes a valores de Rf de 0,833, 0,900 y 0,967.

Los componentes de las fracciones activas mostradas en las figuras 2 y 3 son adecuados para su utilización en composiciones farmacéuticas para el tratamiento del eczema atópico y para otras enfermedades atópicas, así como para la psoriasis.

30 De manera interesante, tras la extracción con agua y, a continuación, con metanol, como se ha descrito anteriormente, las fracciones 2 a 9, y 16 a 21, correspondientes a los intervalos de Rf comprendidos entre 0,067 y 0,300, y entre 0,533 y 0,700, respectivamente, en el ensayo de CD23, potenciaron la expresión de CD23 de manera significativa, y no la inhibieron.

Ejemplo 4

(Comparación)

40 Se extrajo con hexano una solución de PSE222 preparada como se describe en el Ejemplo 1. Se evaporó a sequedad la fracción extraída con hexano, se resuspendió como se ha descrito anteriormente y se ensayó para CD23. El extracto de hexano incrementó significativamente respecto al control la expresión de CD23. Sin embargo, una extracción posterior con agua del PSE222 extraído con hexano mostró la inhibición predicha de la expresión de CD23. Se muestran los resultados en la figura 4.

45 El presente ejemplo confirma la utilidad de extraer cualquiera de las 10 hierbas de PSE222 con un disolvente no polar, con el fin de eliminar componentes no deseados de cualquier potencial composición farmacéutica.

Ejemplo 5

(Comparación)

55 Se mezcló íntimamente 1 g de extracto liofilizado como se describe en el Ejemplo 1 en forma de polvos finos con 10 g de celulosa fibrosa. La celulosa Sigma #6663 es de grado adecuado. Se añadieron 70 ml de una mezcla de butanol; alcohol metilado industrial; agua (BIW) en proporciones 4:1:1 a la mezcla de celulosa y se agitó durante 10 minutos. Se centrifugó la mezcla (5 minutos a 6.000 rpm). El precipitado se resuspendió en 30 ml de BIW y se volvió a centrifugar. Se repitió esta operación y el precipitado se secó en un horno al vacío a 60-70°C.

60 A continuación, se resuspendió la mezcla seca de celulosa en agua destilada, se mezcló durante 10 minutos y se centrifugó. A continuación, se lavó el precipitado con 3 cantidades adicionales de agua y se centrifugó, reuniendo los sobrenadantes. Los sobrenadantes combinados se evaporaron a sequedad, proporcionando aproximadamente 20 mg de un sólido marrón.

65 Este material, cuando se formula con excipientes, se utiliza para rellenar cápsulas, se prensa formando tabletas, o se disuelve en un vehículo farmacéuticamente aceptable, es adecuado para el tratamiento de pacientes con eczema atópico severo. El ejemplo anterior proporciona un método para producir preparaciones farmacéuticas de los componentes activos de PSE222 a escala comercial.

REIVINDICACIONES

1. Material adecuado para el tratamiento de enfermedades atópicas, eczema no atópico o psoriasis, que comprende una decocción o un extracto realizados a partir de las hierbas siguientes:

Radix Paeonia Rubra

Radix Glycyrrhiza

Radix Rehmannia

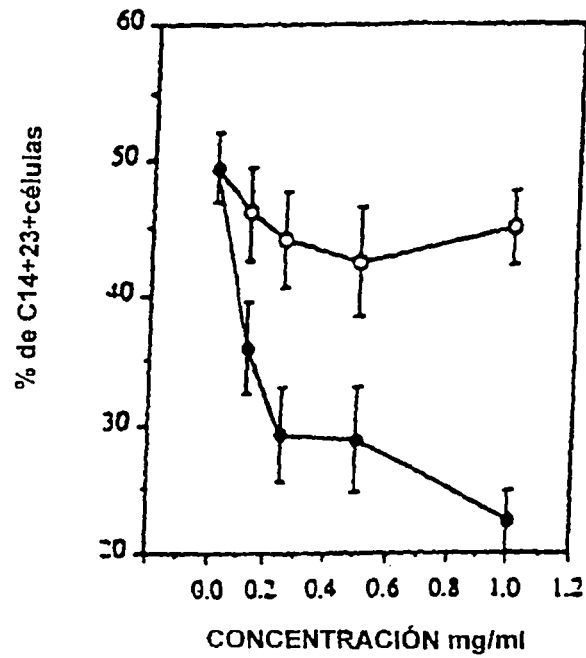
en ausencia sustancial de cualquier otra hierba.

2. Material según la reivindicación 1, que comprende las decocciones o los extractos individuales de las hierbas.

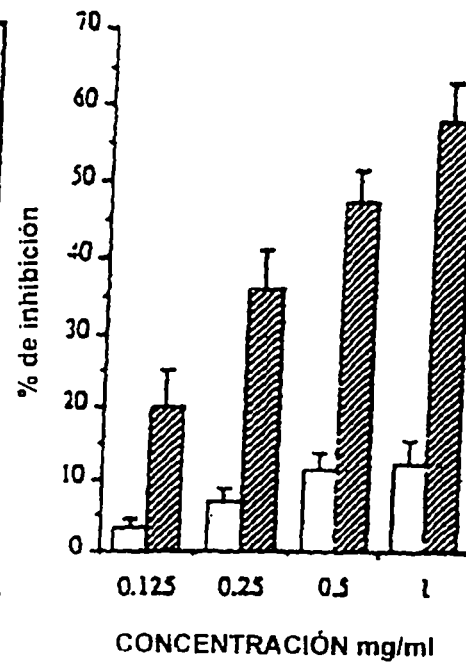
3. Composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades atópicas, eczema no atópico o psoriasis, que comprende el material según la reivindicación 1 ó 2, y un portador farmacéuticamente aceptable.

4. Utilización de un material según la reivindicación 1 ó 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades atópicas, eczema no atópico o psoriasis.

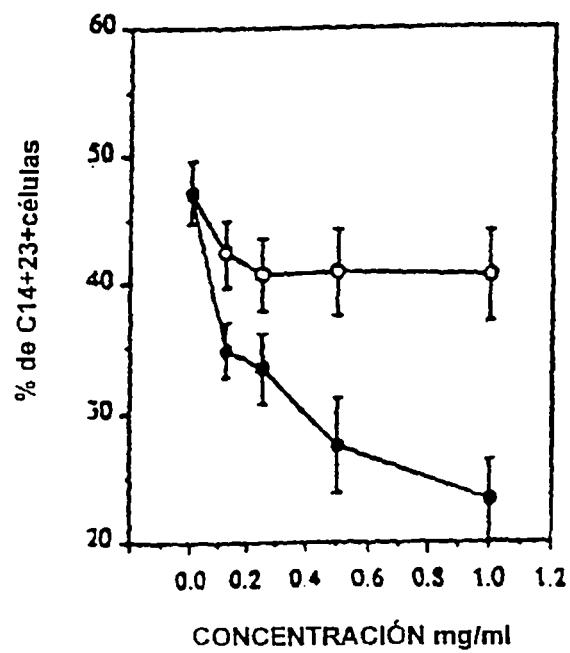
a. FIG. 1



b.



c.



d.

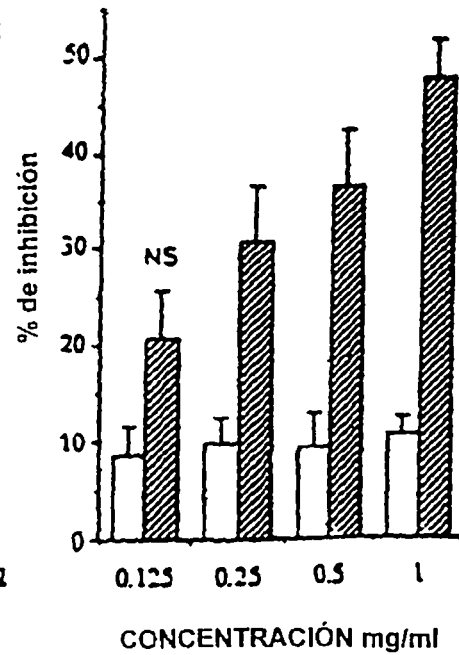


FIG. 2

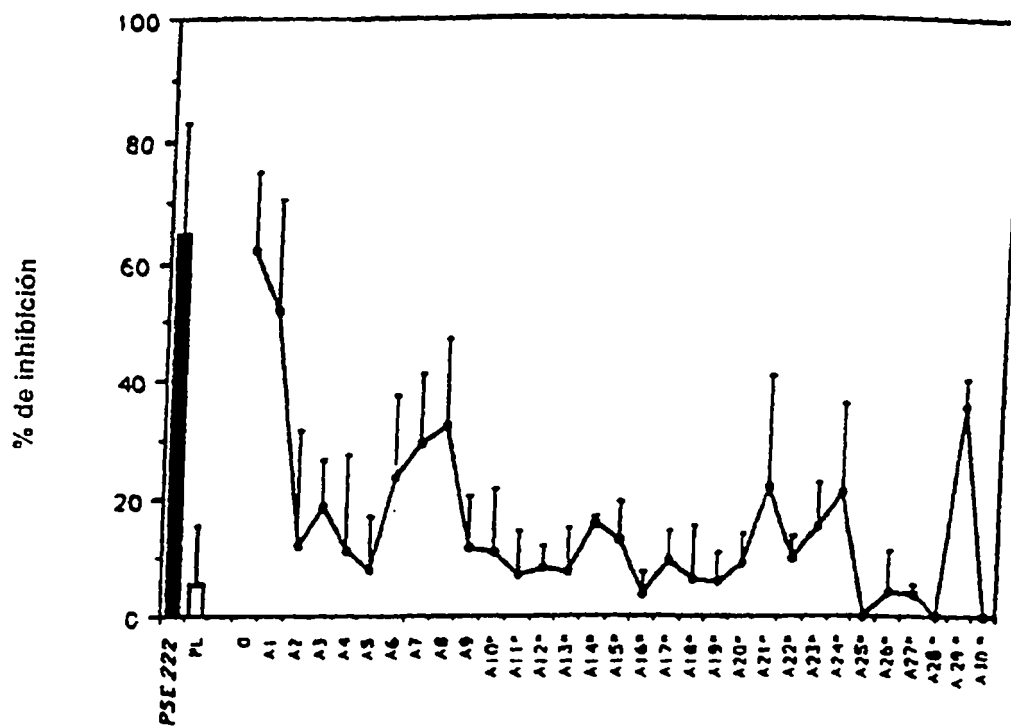


FIG. 3

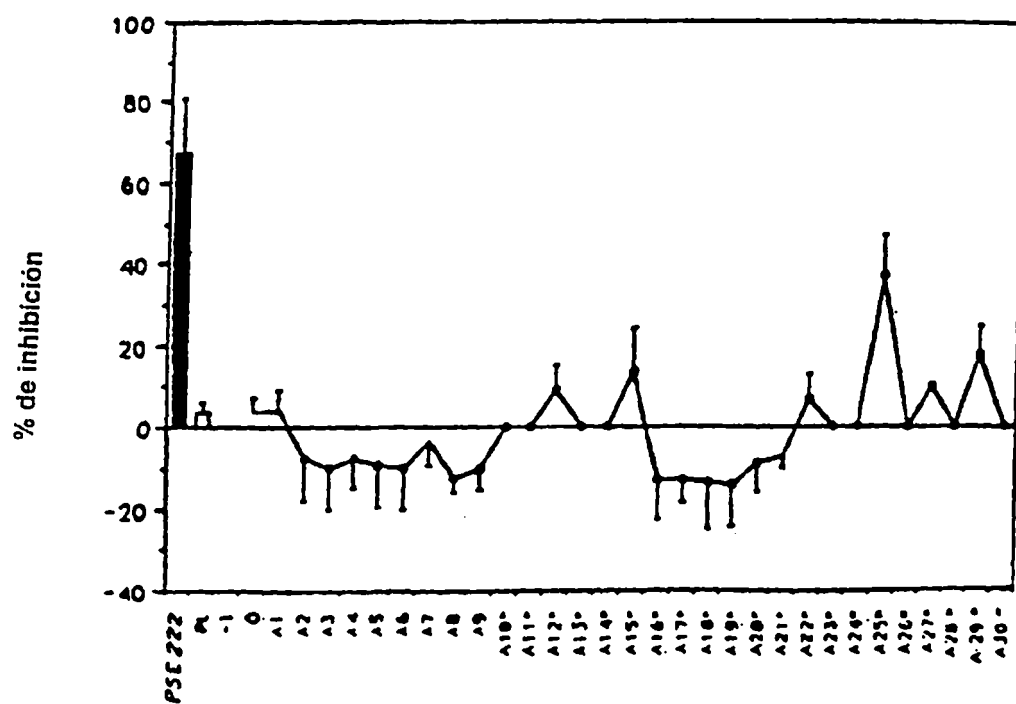


FIG. 4

