

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 255**

51 Int. Cl.:
A61K 31/352 (2006.01)
A61K 36/80 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06768710 .3**
96 Fecha de presentación: **30.05.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1904054**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

54 Título: **COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE UN EXTRACTO DE PSEUDOLYSIMACHION LONGIFOLIUM Y LOS DERIVADOS DE CATAPOL AISLADOS A PARTIR DE ESTE, QUE TIENE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA, ANTIALERGICA Y ANTIASMÁTICA.**

30 Prioridad:
30.05.2005 KR 20050045756
30.05.2005 KR 20050045755
29.05.2006 KR 20060048319
29.05.2006 KR 20060048104

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.11.2011

73 Titular/es:
KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY
51, EOEUN-DONG, YUSEONG-GU,
DAEJEON, 305-806, KR

72 Inventor/es:
LEE, Hyeong Kyu; OH, Sei Ryang;
AHN, Kyung Seop; LEE, Sang Ku;
LEE, Joong Ku; KWON, Ok Kyoung;
KIM, Doo Young; JOUNG, Hyouk;
KIM, Mi Jin; PARK, Bo Young y
QUAN, Gui Hua

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

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).

ES 2 368 255 T3

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica que comprende un extracto de *pseudolysimachion longifolium* y los derivados de catalpol aislados a partir de éste, que tiene actividad antiinflamatoria, antialérgica y antiasmática

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Sector técnico

La presente invención se refiere a una composición que comprende un extracto de *Pseudolysimachion longifolium* y los derivados de catalpol aislados a partir de éste, que tiene actividad antiinflamatoria, antialérgica y antiasmática.

Antecedentes técnicos

El asma se ha considerado un síndrome complejo que se produce en las vías respiratorias, que muestra diversos trastornos tales como obstrucción del flujo de aire, inflamación aguda o crónica, hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR) y remodelación estructural (Kumar R. K. *Pharmacol. Ther.*, 91, págs. 93-104, 2001).

Se ha descrito que la inflamación alérgica que se produce en las vías respiratorias desempeña un papel crítico en el desarrollo del asma y el número de pacientes que padecen asma alérgica ha aumentado hasta aproximadamente el 10% de la población mundial recientemente. Se ha descrito que el número ha alcanzado los diecisiete millones en Estados Unidos y la cuota de mercado de la medicación para asma alérgica se ha ampliado hasta 640 mil millones de dólares en Estados Unidos hasta ahora.

El asma puede clasificarse en dos tipos, es decir, asma extrínseca y asma intrínseca. El asma extrínseca provocada por la exposición de antígeno tal como el ácaro del polvo doméstico *Dermatophagoides* como antígeno principal, polen, epitelio de animal, hongos, etc., muestran reacción positiva en test cutáneo o test de provocación bronquial contra el antígeno, y generalmente se produce en personas más jóvenes. El asma intrínseca causada por infección de las vías respiratorias superiores, ejercicio, inestabilidad emocional, condiciones meteorológicas frías, el cambio de humedad, se produce en pacientes adultos.

Según el aspecto de patofisiología, el asma ha sido reconocida como una inflamación crónica que se produce mediante el siguiente procedimiento; las células inflamatorias proliferan, se diferencian y se activan por causa de citoquinas que se reproducen en células inmunitarias T2 auxiliares y se mueven a las vías respiratorias o al tejido circundante de las mismas. Las células inflamatorias activadas tales como neutrófilos, mastocitos etc., liberan diversos mediadores inflamatorios, tales como citoquinas, quimioquinas, moléculas de señalización, moléculas de adhesión y factores de crecimiento y las células estructurales en las vías respiratorias están implicadas en diversas fases del asma (Elias JA y otros., *J Clin Invest.*, 111, págs 291-7, 2003). En numerosos estudios que utilizan modelos de ratones knockout e investigación clínica, las observaciones críticas en asma podrían estar en varios parámetros característicos, tales como respuestas inmunitarias, eosinofilia, AHR y remodelación estructural (Moffatt JD. *Pharmacol Ther*, 107, págs. 343-57, 2005; Spina D y otros., *Trends Pharmacol Sci*, 23, págs. 311-5, 2002). Cada uno de los parámetros parecen no tener correlaciones directas entre sí; sin embargo, la respuesta inmunitaria mediada por IgE y la eosinofilia son síntomas prominentes en las vías respiratorias de asma alérgica (Bochner B.S. y otros., *Annu. Rev. Immunol.*, 12, págs. 295-335, 1994; Bousquet J y otros., *N. Engl. J. Med.*, 323, págs. 1033-9, 1990), y las citoquinas producidas tales como IL-4, IL-5 e IL-13 en el proceso alérgico también desempeñan un papel importante en el desarrollo de AHR y en la remodelación de las vías respiratorias (Riffo-Vasquez Y y otros., *Pharmacol. Ther.*, 94, págs. 185-211, 2002). De hecho, el asma es el resultado de eventos inflamatorios orquestados, muchos de los cuales implican inhibidores específicos que actúan sobre la ruta del asma, por ejemplo, antagonistas de histamina H1, antagonistas de tromboxano, antagonistas del factor activador de plaquetas, inhibidores de ciclooxigenasa, inhibidores de nitrógeno monooxigenasa e inhibidores de prostaglandina, han sido probados pero han fracasado en ensayos clínicos (Moffatt J.D., *Pharmacol. Ther.*, 107, págs. 343-57, 2005). Por el contrario, los glucocorticoides, que suprimen los niveles precursores de células inflamatorias al valor inicial mediante la inhibición muy extendida de la síntesis de citoquinas y la supervivencia de células inmunitarias mediada por citoquinas, se han utilizado para gestionar los síntomas de pacientes de asma durante un periodo de hasta 30 años (Baatjes AJ. y otros., *Pharmacol. Ther.*, 95, págs. 63-72, 2002). Estos informes sugieren que la estrategia terapéutica para la gestión del asma debe centrarse en la restauración del equilibrio de parámetros asmáticos en lugar de en la búsqueda de potentes inhibidores de rutas específicas del proceso asmático.

Pseudolysimachion longifolium perteneciente al género *Pseudolysimachion*, es una hierba perenne distribuida en Corea, China, Rusia y Europa. Se han descrito muchas especies del mismo género, por ejemplo, *Pseudolysimachion ovutum*, *Pseudolysimachion kiusianum*, *Pseudolysimachion kiusianum var diamanticum*, *Pseudolysimachion kiusianum var villosum*, *Pseudolysimachion dahuricum*, *Pseudolysimachion pyrethrinum*, *Pseudolysimachion linarifolium*, *Pseudolysimachion linarifolium var. villosulum*, *Pseudolysimachion rotundum var. subintegrum*, *Pseudolysimachion rotundum var. coreanum*, *Pseudolysimachion insulare* y *Pseudolysimachion undulata* y las plantas contienen manitol, 6-hidroxiluteolina como ingrediente principal (Chung BS y Shin MK, *HyangyakDaeSaJeon*, Youngrimsa, págs. 913-914, 1998).

65

Sin embargo, no se ha descrito o dado a conocer nada acerca del efecto supresor sobre una enfermedad inflamatoria, alérgica y asmática del extracto de *P. longifolium* y los derivados de catalpol aislados a partir de éste en ninguno de los documentos bibliográficos mencionados anteriormente

Qi Jia y otros, dan a conocer, en el documento Journal of Natural Products, Vol. 62, No. 6, 1999, págs. 901-903, glucósidos iridoides obtenidos de un extracto de metanol acuoso de las raíces de *P. kurroa* que tiene efecto anti-inflamatorio. Las sustancias activas se identificaron como se muestra en la figura 1 de este documento.

El documento CN 1 468 601 A da a conocer preparaciones que comprenden picrósido II para el tratamiento de asma y enfermedades alérgicas e inflamatorias.

Taskova y otros dan a conocer en el documento Plant Systematics and Evolution, col. 231, págs. 1-17, 2002 glucósidos iridoides de los géneros *Veronica* y *Pseudolysimachion*.

Por consiguiente, los inventores de la presente invención han descubierto que el extracto de *P. longifolium* y los derivados de catalpol aislados a partir de éste muestran el efecto supresor sobre parámetros asmáticos, tales como el nivel de IgE, la liberación de citoquinas, y eosinofilia, AR (sensibilidad de las vías respiratorias) e hipersecreción de mucosidad en modelo de ratón sensibilizado con/estimulado con OVA y finalmente completaron la presente invención.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

La presente invención da a conocer una composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 a 4 y un alimento natural según la reivindicación 7 que comprende un extracto o derivados de catalpol aislados a partir de *P. longifolium* como ingrediente activo en una cantidad eficaz para tratar y prevenir una enfermedad inflamatoria, alérgica y asmática.

La presente invención también da a conocer un extracto impuro o extracto soluble en disolvente orgánico de *P. longifolium* según la reivindicación 1 y los derivados de catalpol aislados a partir de éste según la reivindicación 4 para tratar o prevenir una enfermedad inflamatoria, alérgica y asmática.

Características de la invención

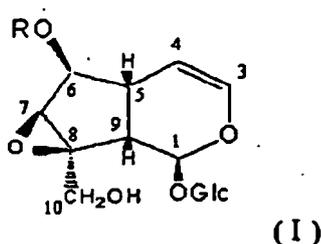
Por consiguiente, es un objetivo de la presente invención dar a conocer una composición que comprende un extracto impuro o extracto soluble en disolvente orgánico de una planta del género *Pseudolysimachion*, como ingrediente activo para el tratamiento y la prevención de una enfermedad inflamatoria, alérgica y asmática.

La expresión "extracto impuro" que se da a conocer en el presente documento comprende el extracto preparado extrayendo material vegetal con agua, alcoholes inferiores tales como metanol, etanol, preferentemente metanol y similares, o sus mezclas.

La expresión "extracto soluble en disolvente orgánico" que se da a conocer en el presente documento puede prepararse extrayendo el extracto impuro descrito anteriormente con disolvente orgánico, por ejemplo, butanol, acetona, acetato de etilo, cloroformo o diclorometano, preferentemente butanol.

La expresión "género *Pseudolysimachion*" que se da a conocer en el presente documento comprende *P. longifolium*, *P. ovutum*, *P. kiusianum*, *P. kiusianum* var. *diamanticum*, *P. kiusianum* var. *villosum*, *P. dahuricum*, *P. pyrethrinum*, *P. linarifolium*, *P. linarifolium* var. *villosulum*, *P. rotundum* var. *subintegrum*, *P. rotundum* var. *coreanum*, *P. insulare* y *P. undulate*.

La presente invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende derivados de catalpol representados mediante la siguiente fórmula química (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos como ingrediente activo en una cantidad eficaz para tratar y prevenir una enfermedad inflamatoria, alérgica y asma.



en la que,

R es independientemente, como mínimo, un grupo seleccionado entre un átomo de hidrógeno, 3,4-dihidroxibenzoilo, 3-hidroxi-4-metoxibenzoilo, 4-hidroxibenzoilo, 3,4-dimetoxibenzoilo, o grupo cinamoilo sustituido con 3,4-dihidroxi y 3-hidroxi-4-metoxi, grupo alquilo inferior C₁-C₃, grupo alcoxi inferior C₁-C₃.

Los derivados de catalpol de la presente invención pueden aislarse a partir de *P. longifolium* o sintetizarse mediante un procedimiento general bien conocido en la técnica (Herbert O. House., Modern Synthetic Reactions, 2ª Ed., The Benjamin/Cummings Publishing Co., 1972).

Según otro aspecto de la presente invención, también se da a conocer un extracto impuro o extracto soluble en disolvente orgánico de una planta del género *Pseudolysimachion*, o los derivados de catalpol aislados a partir de éste para tratar o prevenir una enfermedad inflamatoria, alérgica y asmática.

Un extracto aislado de una planta del género *Pseudolysimachion*, y los derivados de catalpol aislados a partir de éste pueden prepararse según la siguiente realización preferente.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describe con detalle.

Para la presente invención, por ejemplo, la hoja deshidratada de *P. longifolium* se corta en pequeños pedazos y el pedazo se mezcló con de 2 a 20 veces, preferentemente, de 5 a 10 veces el volumen de disolvente polar, por ejemplo, agua, alcohol inferior C₁-C₄ tal como metanol, etanol, butanol o sus mezclas, preferentemente metanol; y se calentó a la temperatura que varía entre 20 y 100°C, preferentemente entre 20 y 50°C, durante el periodo que varía entre 10 y 48 horas, preferentemente 20 y 30 horas, mediante extracción a reflujo con agua caliente, extracción con agua fría, ultra-sonicación o extracción convencional, preferentemente mediante extracción con agua fría; el residuo se filtra y a continuación el filtrado se seca para obtener el extracto soluble en disolvente polar del mismo.

En el extracto impuro anterior preparado mediante la etapa anterior, se suspende en agua, y a continuación se mezcla con de 1 a 100 veces, preferentemente, de 1 a 5 veces el volumen de disolvente orgánico butanol, acetona, acetato de etilo, cloroformo o diclorometano, preferentemente butanol para obtener el extracto soluble en disolvente orgánico de la presente invención.

El extracto soluble en disolvente orgánico anterior se somete adicionalmente a cromatografía en columna de gel de sílice rellena de gel de sílice eluyendo con una mezcla disolvente de cloroformo:metanol aumentando la polaridad cambiando la proporción de mezcla (metanol 0-100%, gradiente escalonado) para obtener varias fracciones. Entre las fracciones, la 3ª fracción se somete adicionalmente a una cromatografía en columna de gel de sílice repetida utilizando una columna de sílice de fase normal (metanol 10-50% gradiente escalonado) para obtener los derivados de catalpol de la presente invención. La estructura se confirmó mediante RMN, EI-MS y rotación óptica con aquellas descritas anteriormente (Afifi-Yazar FÜ y otros., *Helv Chim Acta*, **63**, págs. 1905-7, 1980) y la pureza de los derivados de catalpol se analizó como más del 99,5% mediante el sistema de HPLC.

Según otro aspecto de la presente invención, se da a conocer una composición farmacéutica que comprende un extracto impuro y un extracto soluble en disolvente orgánico de *P. longifolium* o los derivados de catalpol aislados a partir de éste preparados mediante el método de preparación descrito anteriormente para el tratamiento y la prevención de una enfermedad inflamatoria, alérgica y asmática como ingredientes activos.

Según otro aspecto de la presente invención, también se da a conocer un extracto impuro y un extracto soluble en disolvente orgánico de *P. longifolium* o los derivados de catalpol aislados a partir de éste preparados mediante el método de preparación descrito anteriormente para tratar o prevenir una enfermedad inflamatoria, alérgica y asmática.

Los compuestos representados mediante la fórmula general (I) pueden transformarse en su sal y solvatos farmacéuticamente aceptables mediante el método convencional bien conocido en la técnica. Para las sales, la sal de adición de ácidos de las mismas formada mediante un ácido libre farmacéuticamente aceptable de las mismas es útil y puede prepararse mediante el método convencional. Por ejemplo, después de disolver el compuesto en la cantidad en exceso de solución ácida, las sales precipitan mediante el disolvente orgánico miscible en agua tal como metanol, etanol, acetona o acetonitrilo para preparar la sal de adición de ácido de las mismas y además la mezcla de cantidad equivalente de compuesto y ácido diluido con agua o alcohol tal como monometiléter glicólico, puede calentarse y posteriormente secarse mediante evaporación o filtrarse a presión reducida para obtener la forma de sal seca de la misma.

Como ácido libre del método descrito anteriormente, puede utilizarse un ácido orgánico o un ácido inorgánico. Por ejemplo, un ácido orgánico tal como ácido metanosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido cítrico, ácido maleico, ácido succínico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido glicólico, ácido glucónico, ácido galacturónico, ácido glutámico, ácido glutárico, ácido glucurónico, ácido aspártico,

ácido ascórbico, ácido carbonílico, ácido vanílico, ácido yodhídrico y similares, y puede utilizarse un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido tartárico y similares en el presente documento.

5 Además, la forma de sal metálica farmacéuticamente aceptable de compuestos de la invención puede prepararse utilizando una base. La sal de metal alcalino o metal alcalinotérreo de los mismos puede prepararse mediante el método convencional, por ejemplo, después de disolver el compuesto en la cantidad en exceso de solución de hidróxido de metal alcalino o hidróxido de metal alcalinotérreo, las sales insolubles se filtran y el filtrado restante se somete a evaporación y secado para obtener la sal metálica de las mismas. Como sal metálica de la presente
10 invención, las sales de sodio, potasio o calcio son farmacéuticamente adecuadas y la sal de plata correspondiente puede prepararse haciendo reaccionar a la sal de metal alcalino o sal de metal alcalinotérreo con una sal de plata adecuada, tal como nitrato de plata.

15 La sal farmacéuticamente aceptable del presente compuesto comprende toda sal ácida o básica que puede estar presente en los compuestos, si ésta no está indicada específicamente en el presente documento. Por ejemplo, la sal farmacéuticamente aceptable de la presente invención comprende la sal de grupo hidroxilo tal como la sal de sodio, calcio y potasio de la misma; la sal de grupo amino tal como la sal de bromuro de hidrógeno, sal de ácido sulfúrico, sal de ácido hidrogenosulfúrico, sal de fosfato, sal de hidrogenofosfato, sal de dihidrofosfato, sal de acetato, sal de succinato, sal de citrato, sal de tartrato, sal de lactato, sal de mandelato, sal de metanosulfonato (mesilato) y sal de *p*-toluenosulfonato (tosilato) etc., que pueden prepararse mediante el método convencional bien conocido en la técnica.

20 La composición para tratar y prevenir una enfermedad inflamatoria, alérgica y asmática puede comprender los extractos o compuestos descritos anteriormente como el 0,1 ~ 50% en peso en base al peso total de la composición.

25 La composición según la presente invención puede darse a conocer como una composición farmacéutica que contiene vehículos, adyuvantes o diluyentes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidones, goma arábiga, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente cargas, agentes anti-aglutinantes, agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes aromatizantes, emulsionantes, conservantes y similares. Las composiciones de la presente invención pueden formularse para proporcionar liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de su administración a un paciente empleando cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica.

35 Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden disolverse en aceites, propilenglicol u otros disolventes que se utilizan habitualmente para producir una inyección. Los ejemplos adecuados de los vehículos incluyen solución salina fisiológica, polietilenglicol, etanol, aceites vegetales, miristato de isopropilo, etc., pero no se limitan a estos. Para la administración tópica, el extracto de la presente invención puede formularse en forma de pomadas y cremas.

40 Las formulaciones farmacéuticas que contienen la presente composición pueden prepararse en cualquier forma, tal como forma de dosificación oral (polvo, comprimido, cápsula, cápsula blanda, medicamento acuoso, jarabe, píldora de elixires, polvo, sobrecito, gránulo), o preparación tópica (crema, pomada, loción, gel, bálsamo, parche, pasta, solución de pulverización, aerosol y similares), o preparación inyectable (solución, suspensión, emulsión).

45 La composición de la presente invención en formas de dosificación farmacéuticas puede utilizarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, y también puede utilizarse sola o en una asociación apropiada, así como en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos.

50 La dosis deseable del extracto o compuesto de la invención varía dependiendo del estado y el peso del sujeto, la gravedad, la forma del fármaco, la vía y el periodo de administración, y puede ser seleccionada por los expertos en la materia. Sin embargo, para obtener efectos deseables, se recomienda generalmente administrar en la cantidad que varía entre 0,0001 y 100 mg/kg, preferentemente, 0,001 y 10 mg/kg en peso/día del extracto de la presente
55 invención. La dosis puede administrarse una sola vez o dividirse en varias veces al día.

60 La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse a un sujeto animal tal como mamíferos (rata, ratón, animales domésticos o ser humano) mediante diversas vías. Se contemplan todos los modos de administración, por ejemplo, la administración puede realizarse por vía oral, por vía rectal o mediante inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracutánea, intratecal, epidural o intracerebroventricular.

65 Es otro objetivo de la presente invención dar a conocer un alimento natural funcional que comprende el extracto o compuestos aislados a partir de *P. longifolium* junto con un aditivo sitiológicamente aceptable para la prevención y el alivio de una enfermedad inflamatoria, alérgica y asmática.

Para desarrollar un alimento natural funcional, los ejemplos de alimentos que pueden añadirse que comprenden los extractos o compuestos anteriores de la presente invención son diversos alimentos, bebidas, goma, complejo vitamínico, alimento para mejorar la salud y similares, y puede utilizarse en forma de polvo, gránulo, comprimido, comprimido masticable, cápsula o bebida etc.

La composición descrita anteriormente en su interior puede añadirse a alimentos, aditivos o bebida, en la que, la cantidad del extracto o compuesto descrito anteriormente en el alimento o la bebida puede variar generalmente entre aproximadamente el 0,01 y el 80% p/p, preferentemente entre el 0,01 y el 15% p/p del peso total de alimento para la composición de alimento natural y de 0,02 a 5 g, preferentemente de 0,3 a 1 g en la proporción de 100 ml de la composición de bebida natural.

Siempre que la composición de bebida natural de la presente invención contenga el extracto o compuesto descrito anteriormente como un componente esencial en la proporción indicada, no existe ninguna limitación particular respecto al otro componente líquido, en el que el otro componente puede ser diversos desodorantes o carbohidratos naturales etc., tal como bebida convencional. Los ejemplos del carbohidrato natural mencionado anteriormente son monosacárido tal como glucosa, fructosa etc.; disacárido tal como maltosa, sacarosa etc.; azúcar convencional tal como dextrina, ciclodextrina; y alcohol de azúcar tal como xilitol y eritritol etc. Como un desodorante diferente de los mencionados anteriormente, desodorante natural tal como taumatina, extracto de Stevia tal como levaudiosido A, glicirizina y otros., y desodorante sintético tal como sacarina, aspartamo y otros, pueden utilizarse favorablemente. La cantidad de carbohidrato natural descrito anteriormente varía generalmente entre aproximadamente 1 y 20 g, preferentemente 5 y 12 g en la proporción de 100 ml de la presente composición de bebida.

Los componentes diferentes de la composición mencionada anteriormente son diversos nutrientes, una vitamina, un mineral o un electrolito, un agente aromatizante sintético, un agente colorante y agente mejorador en el caso de queso, chocolate y otros, ácido péctico y sus sales, ácido alginico y sus sales, ácido orgánico, adhesivo coloidal protector, agente de control del pH, estabilizante, un conservante, glicerina, alcohol, agente carbonizante utilizado en bebida carbonatada y otros. El componente diferente de los mencionados anteriormente puede ser zumo de fruta para preparar zumo de fruta natural, bebida de zumo de fruta y bebida a base de hortalizas, en la que el componente puede utilizarse de forma independiente o en combinación. La proporción de los componentes no es tan importante sino que generalmente varía entre aproximadamente el 0 y el 20% p/p por 100% p/p de la presente composición. Los ejemplos de alimento que puede añadirse que comprende el extracto mencionado anteriormente en su interior son diversos alimentos, bebida, goma, complejo vitamínico, alimento para mejorar la salud y similares.

El extracto de la presente invención no tiene toxicidad ni efectos adversos, por lo tanto pueden utilizarse de forma segura.

La presente invención se explica de forma más específica mediante los siguientes ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que la presente invención no está limitada en absoluto a estos ejemplos.

Descripción breve de los dibujos

Los anteriores y otros objetivos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que;

La figura 1 muestra los efectos de un extracto de *P. longifolium* sobre el reclutamiento de células inflamatorias en fluido de lavado broncoalveolar,

La figura 2 muestra los efectos de la fracción 3 aislada a partir de *P. longifolium*, verprósido y picrósido II sobre el reclutamiento de células inflamatorias en fluido de lavado broncoalveolar,

La figura 3 representa los efectos de un extracto de *P. longifolium* sobre células de tejido pulmonar utilizando el examen histológico de lavado broncoalveolar (A: ratones de control normales, B: ratones tratados con PBS, C: ratones tratados con extracto de *P. longifolium*),

La figura 4 presenta los efectos de un extracto de *P. longifolium* y los compuestos aislados a partir de éste sobre células de tejido pulmonar utilizando el examen histológico de lavado broncoalveolar (A: ratones de control normales, B: ratones tratados con PBS, C: ratones tratados con verprósido, D: ratones tratados con picrósido II, E: ratones tratados con montelukast).

Mejor modo de llevar a cabo la presente invención

La presente invención se explica más específicamente mediante los siguientes ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que la presente invención no está limitada en absoluto a estos ejemplos.

EJEMPLOS

El siguiente Ejemplo de Referencia, Ejemplos y Ejemplos Experimentales pretenden ilustrar adicionalmente la presente invención sin limitar su alcance.

5

Ejemplo 1. Preparación del extracto impuro de *P. longifolium*

Se cortaron 7,9 kg de *P. longifolium* deshidratado en pequeños pedazos, se mezclaron con 50 l de metanol y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas, se extrajo con agua fría tres veces. El extracto se filtró con papel del filtro para eliminar los restos. El filtrado se reunió y se concentró mediante evaporador rotatorio 55-65°C a presión reducida y se secó con liofilizador para obtener 950,5 g de extracto impuro seco de *P. longifolium*.

10

Ejemplo 2. Preparación de extracto soluble en disolvente polar y disolvente no polar

15

2-1. Preparación de la fracción soluble en acetato de etilo

Se añadieron 10 l de agua destilada a 425 g del extracto impuro obtenido en el ejemplo 1. Se añadieron 10 l de acetato de etilo a esto en un embudo de decantación y se agitó vigorosamente para dividirlo en la capa soluble en acetato de etilo y la capa soluble en agua.

20

La capa soluble en acetato de etilo anterior se concentró mediante evaporador rotatorio, se secó con liofilizador para obtener el extracto soluble en acetato de etilo.

25

2-2. Preparación de la fracción soluble en butanol/agua

La capa soluble en agua se fraccionó mezclándola con 10 l de butanol y, finalmente, se obtuvieron 144,0 g de extracto soluble en n-butanol y extracto soluble en agua para utilizarlos como muestra en los siguientes experimentos.

30

Ejemplo 3. Preparación de derivados de catalpol a partir del extracto de *P. longifolium***3-1. Preparación de verprósido (6-O-3,4-Dihidroxibenzoil catalpol)**

Se sometieron 144,0 g de la fracción soluble en n-butanol a una cromatografía en columna de gel de sílice (70-230 de malla, 8,5 x 65 cm) y se eluyeron con una mezcla de cloroformo-metanol (metanol 0-100%, gradiente escalonado) para obtener cinco fracciones. 29,1 g de la fracción 2 (entre cloroformo-metanol 7/3-6/4, v/v) se sometieron a cromatografía en columna repetida utilizando una cromatografía en columna de sílice de fase normal (gel de sílice, 230-400 de malla, 6,0 x 60 cm, mezcla de cloroformo-metanol, metanol 10-50% gradiente escalonado). Las fracciones 2-4 se sometieron a recristalización en metanol para obtener 14,2 g de verprósido, es decir, 6-O-3,4-Dihidroxibenzoil catalpol. La estructura se confirmó mediante RMN (¹H, ¹³C, DEPT, HMQC, HMBC), EI-MS y rotación óptica con aquellas confirmadas previamente (Afifi-Yazar F y otros., *Helv Chim Acta*, **63**, págs. 1905-7, 1980) y la pureza del verprósido se analizó en más del 99,5% mediante el sistema de HPLC (Shimadzu SCL-10A con detector SPD-M 10A vp PDA, columna; Phenomenex Synergi 4 µm Fusion RP-80, 4,6 x 150 mm, elución: MeOH/DW, 35/65, v/v, 0,8 ml/minuto).

35

40

45

6-O-3,4-Dihidroxibenzoil catalpol (verprósido)

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 2,47 (1H, *dd*, J = 8,0, 9,2 Hz, H-9), 2,59 (1H, *dddd*, J = 1,6, 4,0, 8,0, 8,0, H-5), 3,00 (1H, *m*, H-G4), 3,05 (1H, *m*, H-G2), 3,14 (1H, *m*, H-G5), 3,18 (1H, *m*, H-G3), 3,42, 3,71 (2H, *m*, H-G6). 3,67 (1H, *s*, H-7), 3,71, 3,91 (2H, *d*, J = 13,2 Hz, cada uno, H-10), 4,61 (1H, *d*, J = 7,6 Hz, H-G1), 4,94 (1H, *dd*, J = 4,0, 6,0 Hz, H-4), 5,03 (1H, *d*, J = 8,0 Hz, H-6), 5,09 (1H, *d*, J = 9,2 Hz, H-1), 6,41 (1H, *dd*, J = 1,6, 6,0 Hz, H-3), 6,82 (1H, *d*, J = 8,0 Hz, H-5'), 7,35 (1H, *dd*, J = 2,0, 8,0 Hz, H-6'), 7,39 (1H, *d*, J = 2,0 Hz, H-2').

50

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 93,0 (C-1), 141,1 (C-3), 101,8 (C-4), 35,2 (C-5), 79,5 (C-6), 58,2 (C-7), 65,8 (C-8), 41,8 (C-9), 120,0 (C-1'), 116,4 (C-2'), 145,1 (C-3'), 150,8 (C-4'), 115,4 (C-5'), 122,6 (C-6'), 165,6 (C-7'), 97,9 (C-G1), 73,4 (C-G2), 76,4 (C-G3), 70,3 (C-G4), 77,5 (C-G5), 61,4 (C-G6).

55

3-2. Preparación de isovanilil catalpol a partir del extracto de *P. longifolium*

60

Se sometieron 17,3 g de la fracción 3 a cromatografía en columna utilizando una columna de sílice de fase normal (gel de sílice, 230-400 de malla, 6,0 x 60 cm, mezcla de cloroformo-metanol, metanol 10-50% gradiente escalonado). 8,5 g de la fracción 3-3 se sometieron a recristalización en metanol para obtener 7,2 g de isovanilil catalpol, es decir, 6-O-3-hidroxi-4-metoxibenzoil catalpol.

65

6-O-3-hidroxi-4-metoxibenzoil catalpol (isovanilil catalpol)

5 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,47 (1H, *m*, H-9), 2,55 (1H, *m*, H-5), 3,00 (1H, *m*, H-G4), 3,05 (1H, *m*, H-G2), 3,14 (1H, *m*, H-G5), 3,18 (1H, *m*, H-G3), 3,43, 3,70 (2H, *m*, H-G6), 3,70 (1H, *s a*, H-7), 3,72, 3,92 (2H, *d*, $J = 13,2$, cada uno, H-10), 4,62 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-G1), 4,95 (1H, *dd*, $J = 4,4$, 6,0 Hz, H-4), 5,06 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-6), 5,11 (1H, *d*, $J = 9,2$ Hz, H-1), 6,42 (1H, *d*, $J = 6,0$ Hz, H-3), 7,04 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz, H-5'), 7,42 (1H, *s a*, H-2'), 7,48 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz, H-6'), 3,84 (3H, *s*, 4'-O-CH₃).

10 $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 93,0 (C-1), 141,0 (C-3), 101,6 (C-4), 35,2 (C-5), 79,7 (C-6), 58,2 (C-7), 65,8 (C-8), 41,8 (C-9), 58,4 (C-10), 121,7 (C-1'), 115,7 (C-2'), 146,3 (C-3'), 152,1 (C-4'), 111,4 (C-5'), 121,3 (C-6'), 165,3 (C-7'), 97,8 (C-G1), 73,4 (C-G2), 76,4 (C-G3), 70,3 (C-G4), 77,4 (C-G5), 61,4 (C-G6), 55,7 (4'-OCH₃).

3-3. Preparación de picróside II y verminósido a partir del extracto de *P. longifolium*

15 Se sometieron 1,5 g de la fracción 3-5 a columna de gel de sílice de fase inversa (RP-18, Gel YMC ODS-A, 6,0 x 60 cm, metanol/agua, 1/4, v/v), se sometieron a cromatografía en columna sepalex LH-20 (metanol/agua, 85/15, v/v) para obtener 101,0 mg de picróside II, es decir, 6-O-4-hidroxi-3-metoxibenzoilo y 30,0 mg de verminósido, es decir, 6-O-3,4-dihidroxicinamoil catalpol.

6-O-4-hidroxi-3-metoxibenzoilo (picróside II) (comparativo)

25 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,47 (1H, *dd*, $J = 8,0$, 9,6 Hz, H-9), 2,58 (1H, *dddd*, $J = 1,2$, 6,0, 8,0, 8,4 Hz, H-5), 3,00 (1H, *m*, H-G4), 3,05 (1H, *m*, H-G2), 3,14 (1H, *m*, H-G5), 3,18 (1H, *m*, H-G3), 3,42, 3,71 (2H, *m*, H-G6), 3,67 (1H, *s a*, H-7), 3,72, 3,92 (2H, *d*, $J = 13,2$, cada uno, H-10), 4,62 (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz, H-G1), 4,99 (1H, *dd*, $J = 4,4$, 6,0 Hz, H-4), 5,06 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz, H-6), 5,11 (1H, *d*, $J = 9,6$ Hz, H-1), 6,42 (1H, *dd*, $J = 1,2$, 6,0 Hz, H-3), 6,89 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz, H-5'), 7,46 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 7,52 (1H, *dd*, $J = 2,0$, 8,4 Hz, H-6'), 3,83 (3H, *s*, 3'-OCH₃).

30 $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 93,0 (C-1), 141,1 (C-3), 101,8 (C-4), 35,2 (C-5), 79,7 (C-6), 58,2 (C-7), 65,8 (C-8), 41,8 (C-9), 58,5 (C-10), 120,0 (C-1'), 112,7 (C-2'), 147,5 (C-3'), 152,0 (C-4'), 115,3 (C-5'), 123,8 (C-6'), 165,6 (C-7'), 97,9 (C-G1), 73,4 (C-G2), 76,4 (C-G3), 70,3 (C-G4), 77,5 (C-G5), 61,4 (C-G6), 55,7 (3'-OCH₃).

6-O-3,4-dihidroxicinamoil catalpol (verminósido)

35 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,43 (1H, *m*, H-9), 2,45 (1H, *m*, H-5), 3,01 (1H, *6 m*, H-G4), 3,05 (1H, *m*, H-G2), 3,14 (1H, *m*, H-G5), 3,18 (1H, *m*, H-G3), 3,42, 3,70 (2H, *m*, H-G6), 3,64 (1H, *s a*, H-7), 3,71, 3,90 (2H, *d*, $J = 13,2$ Hz, cada uno, H-10), 4,61 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz, H-G1), 4,94 (1H, *dd*, $J = 4,0$, 5,6 Hz, H-4), 4,99 (1H, *d*, $J = 7,2$ Hz, H-6), 5,08 (1H, *d*, $J = 9,2$ Hz, H-1), 6,42 (1H, *d*, $J = 5,6$ Hz, H-3), 6,77 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 7,08 (1H, *d*, $J = 1,6$ Hz, H-2'), 7,05 (1H, *dd*, $J = 1,6$, 8,0 Hz, H-6').

40 $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 92,9 (C-1), 141,1 (C-3), 101,7 (C-4), 35,1 (C-5), 79,2 (C-6), 58,2 (C-7), 65,7 (C-8), 41,8 (C-9), 58,5 (C-10), 125,4 (C-1'), 115,8 (C-2'), 146,0 (C-3'), 148,6 (C-4'), 113,3 (C-5'), 121,6 (C-6'), 145,6 (C-7'), 115,0 (C-8'), 97,9 (C-G1), 73,4 (C-G2), 76,4 (C-G3), 70,3 (C-G4), 77,5 (C-G5), 61,4 (C-G6).

3-4. Preparación de 6-O-veratroil catalpol a partir del extracto de *P. longifolium*

45 Se sometieron 6,2 g de la fracción 4 a cromatografía en columna. 1,2 g de la fracción 4-3 se sometieron a recristalización en metanol para obtener 672,6 mg de 6-O-veratroil catalpol, es decir, 6-O-3,4-Dimetoxibenzoilo.

6-O-(3,4-dimetoxibenzoil) catalpol (6-O-veratroil catalpol)

50 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,47 (1H, *dd*, $J = 8,0$, 9,6 Hz, H-9), 2,59 (1H, *dddd*, $J = 1,6$, 4,8, 8,0, 8,0 Hz, H-5), 3,00 (1H, *m*, H-G4), 3,05 (1H, *m*, H-G2), 3,14 (1H, *m*, H-G5), 3,18 (1H, *m*, H-G3), 3,42, 3,71 (2H, *m*, H-G6), 3,70 (1H, *s a*, H-7), 3,72, 3,90 (2H, *d*, $J = 13,2$ Hz, cada uno, H-10), 4,61 (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz, H-G1), 4,97 (1H, *dd*, $J = 4,8$, 6,0 Hz, H-4), 5,08 (1H, *d*, $J = 8,8$ Hz, H-6), 5,10 (1H, *d*, $J = 9,6$ Hz, H-1), 6,42 (1H, *dd*, $J = 1,6$, 6,0 Hz, H-3), 7,09 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz, H-5'), 7,46 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 7,64 (1H, *dd*, $J = 2,0$, 8,4 Hz, H-6'), 3,81, 3,84 (6H, *s* cada uno, 3',4'-OCH₃).

60 $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 92,9 (C-1), 141,1 (C-3), 101,8 (C-4), 35,2 (C-5), 79,9 (C-6), 58,2 (C-7), 65,9 (C-8), 41,8 (C-9), 58,4 (C-10), 121,3 (C-1'), 111,8 (C-2'), 148,5 (C-3'), 153,2 (C-4'), 111,2 (C-5'), 123,5 (C-6'), 165,5 (C-7'), 97,8 (C-G1), 73,4 (C-G2), 76,4 (C-G3), 70,3 (C-G4), 77,5 (C-G5), 61,4 (C-G6), 55,6, 55,7 (3', 4'-OCH₃).

3-5. Preparación de minecósido a partir del extracto de *P. longifolium*

Se sometieron 261,0 mg de la fracción 4-4 y 288,0 mg de la fracción 4-5 a cromatografía en columna de gel de sílice repetida (mezcla de cloroformo-metanol, metanol 10-20% gradiente escalonado) para obtener 52,5 mg de minecósido, es decir, 6-O-3-hidroxi-4-metoxicinamoil catalpol.

6-O-3-hidroxi-4-metoxicinamoil catalpol (minecósido)

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 2,46 (1H, *m*, H-9), 2,48 (1H, *m*, H-5), 3,00 (1H, *m*, H-G4), 3,05 (1H, *m*, H-G2), 3,14 (1H, *m*, H-G5), 3,18 (1H, *m*, H-G3), 3,42, 3,70 (2H, *m*, H-G6), 3,67 (1H, *s a*, H-7), 3,72, 3,91 (2H, *d*, *J* = 13,2 Hz, cada uno, H-10), 4,61 (1H, *d*, *J* = 8,8 Hz, H-G1), 4,94 (1H, *dd*, *J* = 4,0, 6,0 Hz, H-4), 5,00 (1H, *d*, *J* = 7,2 Hz, H-6), 5,09 (1H, *d*, *J* = 9,2 Hz, H-1), 6,42 (1H, *dd*, *J* = 1,2, 5,6 Hz, H-3), 6,96 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-5'), 7,13 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-2'), 7,17 (1H, *dd*, *J* = 2,0, 8,0 Hz, H-6'), 3,82 (3H, *s*, -OCH₃).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 93,0 (C-1), 141,1 (C-3), 101,7 (C-4), 35,1 (C-5), 79,3 (C-6), 58,2 (C-7), 65,7 (C-8), 41,8 (C-9), 58,5 (C-10), 126,8 (C-1'), 114,5 (C-2'), 146,7 (C-3'), 150,2 (C-4'), 112,0 (C-5'), 121,4 (C-6'), 145,7 (C-7'), 114,5 (C-8'), 97,9 (C-G1), 73,4 (C-G2), 76,4 (C-G3), 70,3 (C-G4), 77,5 (C-G5), 61,4 (C-G6), 55,6 (4'-OCH₃).

3-6. Preparación de catalpol a partir del extracto de *P. longifolium*

Se hidrolizó verprósido a catalpol producido (compuesto 1) con 0,1 N de KOH. La solución se agitó durante 8 horas a temperatura ambiente y se neutralizó con 0,1 N de solución de HCl. El producto se concentró mediante evaporador rotatorio a presión reducida, se sometió a columna de gel de sílice de fase inversa (RP18, metanol/agua, 1/4, v/v), y produjo 54,0 mg de catalpol.

Catalpol

¹H-RMN (400 MHz, DMSO d₆) δ: 2,12 (1H, *dddd*, *J* = 1,6, 4,0, 8,0, 8,0 Hz, H-5), 2,31 (1H, *d*, *J* = 8,0, 9,6 Hz, H-9), 3,00 (1H, *m*, H-G4), 3,05 (1H, *m*, H-G2), 3,11 (1H, *m*, H-G5), 3,17 (1H, *m*, H-G3), 3,34 (1H, *s a*, H-7), 3,40, 3,70 (2H, *m*, H-G6), 3,63, 3,87 (2H, *d*, *J* = 12,8, cada uno, H-10), 3,76 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-6), 4,59 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-G1), 4,90 (1H, *d*, *J* = 9,6 Hz, H-1), 5,01 (1H, *dd*, *J* = 4,6, 6,0 Hz, H-4), 6,36 (1H, *dd*, *J* = 1,6, 6,0 Hz, H-3).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 93,2 (C-1), 140,2 (C-3), 103,3 (C-4), 37,4 (C-5), 77,1 (C-6), 60,7 (C-7), 64,8 (C-8), 42,1 (C-9), 58,9 (C-10), 97,8 (C-G1), 73,4 (C-G2), 76,4 (C-G3), 70,2 (C-G4), 77,4 (C-G5), 61,3 (C-G6).

Ejemplo experimental 1. Ensayo MTT

Para investigar el efecto citotóxico del extracto de *P. longifolium* de la invención y el compuesto aislado a partir de éste, se determinó mediante el método de ensayo de (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Wang Z y otros., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, págs. 159-162, 2001).

Se sembraron células HL-60 promielóticas (HL-18103, 5 x 10⁵ células/ml) en placas de 96 pocillos en condiciones sin NGF. Después de 24 horas de incubación, las células se trataron con la mezcla de muestras disueltas en 10 µl de DMSO y 10 µl de solución de MTT (5 mg/ml), y se incubaron durante 4 horas en condiciones similares. 4 horas después, el MTT se eliminó y se añadieron gota a gota 100 µl de DMSO a cada pocillo para disolver los cristales. A 570 nm, se midió la absorbancia UV mediante un lector de microplacas (BIO-RAD, Estados Unidos) para calcular la viabilidad celular.

Tal como se muestra en la Tabla 1, el resultado demuestra que la viabilidad celular varía entre el 98% y el 116% en 50 µM, entre el 95% y el 114% en 100 µM. Se confirma que un extracto de la invención o compuesto de la presente invención no tiene toxicidad celular.

[Tabla 1] Efecto de compuestos aislados a partir de *P. longifolium* sobre células HL-60.

Muestra	Viabilidad celular (%)	
	50 µM	100 µM
Verprósido	105	102
6-O-veratroil catalpol	116	114
Minecósido	98	95

Ejemplo experimental 2. Hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR)

La AHR se evaluó mediante el cálculo de los valores Penh (pausa aumentada) 24 horas después de la estimulación final con OVA. El valor Penh del grupo tratado con OVA era significativamente más alto que el del grupo de control con PBS. En el grupo estimulado con extracto de *P. longifolium* + OVA, el valor Penh era significativamente reducido en comparación con el del grupo tratado con OVA a 30 mg/ml de metacolina (tabla 2). En el grupo estimulado con

verprósido + OVA, el valor Penh era significativamente reducido en comparación con el del grupo tratado con OVA ($P < 0,05$) Un control positivo, montelukast (ML), que se ha utilizado ampliamente como fármaco anti-asmático, mostraba una disminución similar de AHR con verprósido (figura 1).

5 Tabla 2 Efecto del extracto de *P. longifolium* sobre la hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR)

Metacolina (mg/ml)	valor Penh			
	0	5	10	30*
grupo estimulado con OVA	0,66 ± 0,23	1,79 ± 0,47	2,75 ± 0,91	4,59 ± 1,07
OVA + extracto de <i>P. longifolium</i> (% de inhibición)	0,65 ± 0,018 (-)	1,33 ± 0,53 (25,7%)	2,46 ± 0,26 (10,5%)	2,85 ± 0,72* (38,0%)

* diferencia significativa respecto al grupo tratado con OVA $p < 0,05$

Ejemplo experimental 3. Efecto de *P. longifolium* sobre eosinofilia inducida por OVA en BALF

10 3-1. Sensibilización animal y estimulación de las vías respiratorias

Se adquirieron ratones BALB/c hembra sin patógenos específicos de 8-10 semanas de edad, que se criaron de forma rutinaria serológicamente en busca de patógenos respiratorios relevantes, de ORIENT Co Ltd (Seúl, Corea).

15 El siguiente tratamiento: (1) sensibilización falsa más estimulación con solución salina tamponada con fosfato (PBS; ipNeb); (2) sensibilización más estimulación con OVA (ovoalbúmina: Sigma A5503; Sigma, St. Louis, MO) (ipNeb); (3) sensibilización con OVA (i.p.) más estimulación con OVA (Neb) y muestras (extracto de *P. longifolium* o montelukast) le fue realizado al grupo de ratones ($n = 5$). En resumen, los ratones se sensibilizaron mediante inyección intraperitoneal de 20 µg de OVA, que se emulsionó con 2 mg de hidróxido de aluminio en 100 µl de tampón PBS (pH 7,4) los días 0 y 14. Los ratones se estimularon a través de las vías respiratorias con OVA (al 1% en PBS) durante 20 minutos utilizando un nebulizador ultrasónico (NE-U12; Omron Corp., Tokio, Japón) los días 28, 29 y 30 después de la sensibilización inicial. Los ratones se sacrificaron 48 horas después de la última estimulación (día 32) para determinar el efecto de supresión del extracto de *P. longifolium* o verprósido sobre las vías respiratorias de asma alérgica.

25 3-2. Tratamiento de la muestra

El extracto de *P. longifolium* y verprósido se suspendieron en PBS y se administraron por vía intragástrica utilizando una aguja de alimentación roma de acero inoxidable de calibre 25, 1 h antes de cada estimulación, y los animales de control se expusieron solamente en la solución de PBS. Como control positivo, se trató montelukast (MSD Korea Ltd., Seúl, Corea) con el mismo procedimiento en el experimento.

30 Los ratones se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital (Sigma P3761) 24 h después de la última estimulación, y se realizó una traqueotomía. Después de enfriar con hielo 0,5 ml de PBS se instilaron en los pulmones, se obtuvo fluido de lavado broncoalveolar (BALF) mediante aspiración tres veces (total 1,5 ml) mediante canulación traqueal (Yamazaki T, *J. Jap. Bot.*, **43**, págs. 117-24, 1968).

35 3-3. Recuentos de células inflamatorias en fluido de lavado broncoalveolar

40 El número total de células inflamatorias se evaluó contando células en, como mínimo, cinco cuadros de un hemocitómetro después de excluir células muertas confirmadas mediante tinción con azul de tripano (Daigle I. y otros., *Swiss Med Wkly*, **131**, págs. 231-7, 2001). 100 µl de BALF se cargaron en un portaobjetos y se centrifugaron (200 x g, 4°C, 10 minutos) para fijar las células al portaobjetos utilizando una máquina Cytospine (Hanil Science Industrial, Corea). Las células se tiñeron con reactivos de tinción Diff-Quick® (Sysmex, No. de Cat. 38721, Suiza) según las instrucciones del fabricante. La significación estadística se determinó mediante test t de Student de dos ramas para medias independientes y el nivel crítico de significación se fijó en $P < 0,05$.

45 Para evaluar la supresión de verprósido sobre la eosinofilia en ratones estimulados con OVA, las células reclutadas en el BALF se contaron 48 horas después de la última estimulación. La OVA causó una marcada afluencia de leucocitos en el BALF a partir de un grupo de control de PBS. Tal como se muestra en la figura 2, las células totales se contaron como $40,5 \pm 16,4 \times 10^4$ células/ratón ($P < 0,001$) en comparación con el control tratado con PBS ($2,3 \pm 0,6 \times 10^4$ células/ratón). Se descubrió que los eosinófilos eran menos del 5% de las células totales en los ratones tratados con PBS, sin embargo, estos aumentaban dramáticamente hasta ser más del 75% de los leucocitos totales en el BALF de ratones estimulados con OVA. En los ratones tratados con verprósido, la migración celular se 55 atenuaba significativamente; disminución del $79,3 \pm 13,1\%$ en las células totales ($P < 0,005$) y del $86,2 \pm 7,2\%$ en eosinófilos ($P < 0,001$) a partir de un grupo de control tratado con OVA. Un control positivo, montelukast (ML), mostraba un efecto supresor similar de afluencia de leucocitos en BALF como una disminución del $78,3 \pm 12,1\%$ en células totales ($P < 0,005$) y disminución del $80,7 \pm 11,1\%$ en eosinófilos ($P < 0,005$) (figura 2). En el tratamiento del

extracto de *P. longifolium* + OVA, los reclutamientos de células también estaban significativamente atenuados; disminución del $66,0 \pm 13,2\%$ en células totales y disminución del $75,8 \pm 7,6\%$ en eosinófilos, respectivamente.

Ejemplo experimental 4. Histología pulmonar

5 Para estimar el efecto supresor de verprósido sobre la eosinofilia, se recogieron tejidos pulmonares 48 horas después de la última estimulación. El tejido pulmonar se fijó durante 24 h en formalina tamponada neutra al 10%. Una vez incluido en parafina, es cortado en secciones de $4 \mu\text{m}$ de grosor y el tejido se tiñó con solución H&E (hematoxilina; Sigma MHS-16 y eosina, Sigma HTI 10-1-32). En los ratones estimulados con OVA, se descubrió que los leucocitos se infiltraban en el tejido conectivo peri-bronquiolar y peri-vascular; de estos leucocitos, se observó principalmente eosinofilia (figura 3-II, $P < 0,005$). En los ratones estimulados con verprósido + OVA, la infiltración de leucocitos ricos en eosinófilos se atenuaba significativamente en comparación con los ratones tratados con OVA (figura 3-III, $P < 0,05$). El efecto supresor de Montelukast (ML) se mostró similar al de verprósido (figura 3-IV, $P < 0,05$). En el tratamiento de extracto de *P. longifolium* + OVA, se descubrió claramente el efecto supresor de infiltración de leucocitos (figura 3-V).

En tinción con Ácido Peryódico de Schiff (PAS), la sobreproducción de mucosidad en los ratones tratados con OVA se observó claramente como un color violeta en las vías respiratorias bronquiales en comparación con los ratones normales. Por el contrario, la mucosidad disminuía marcadamente en los ratones estimulados con verprósido + OVA (figura 4-A). La hiperplasia de células caliciformes en el epitelio de las vías respiratorias se cuantificó en base a un sistema de cinco puntos: 0, sin células caliciformes; 1, $< 25\%$ del epitelio; 2, $25-50\%$ del epitelio; 3, $50-75\%$ del epitelio; 4, $>75\%$ del epitelio. Para cada ratón, se analizaron cinco secciones de las vías respiratorias que se distribuyeron aleatoriamente por todo el pulmón izquierdo, y se calcularon sus valores promedio. El análisis cuantitativo de la producción de mucosidad se realizó utilizando un analizador de imágenes (Leica Microsystem Imaging solution Ltd.; Cambridge, Reino Unido). Tal como se muestra en la figura 4-B, el área de mucosidad se valoró como $3,60 \pm 0,64$ en los ratones tratados con OVA en comparación con los ratones tratados con PBS ($P < 0,05$) y disminuía significativamente a $1,43 \pm 0,23$ en los ratones tratados con verprósido + OVA ($P < 0,05$), que era incluso inferior a la referencia positiva, montelukast ($1,53 \pm 0,24$, $P < 0,05$).

Estos resultados demostraron que el verprósido reducía la eosinofilia y la hipersecreción de mucosidad significativamente en el proceso de remodelación de las vías respiratorias.

Ejemplo experimental 5. Medición de IgE y citoquinas

35 Se adquirieron pares de anticuerpos de captura y detección complementarios para anticuerpos IgE de ratón de PharMingen (San Diego, CA), y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de IgE se realizó según las instrucciones del fabricante. Se diluyeron muestras por duplicado en plasma a 1:100. Los niveles de IgE en cada muestra se midieron a partir de lecturas de densidad óptica a 450 nm , y las concentraciones de IgE se calcularon a partir de una curva patrón que se generó utilizando IgE recombinante ($5-2.000 \text{ ng/ml}$). La cantidad de IL-4 e IL-13 contenida en BALF se midió con un kit de ELISA específico de ratón (R&D Systems; Minneapolis, MN). El límite de detección de los ensayos era de 250 pg/ml .

45 Tal como se muestra en las figuras 5-A y 5-B, se descubrió que los niveles de IgE aumentaban enormemente en los ratones tratados con OVA: $85,6 \pm 17,3 \mu\text{g/ml}$ (plasma, $P < 0,05$) y $59,4 \pm 38,4$ (BALF, $P < 0,005$) en comparación con los ratones tratados con PBS ($16,9 \pm 23,9 \mu\text{g/ml}$ en plasma, $1,0 \pm 0,1 \text{ ng/ml}$ en BALF). Los niveles de IgE de ratones tratados con verprósido se reducían significativamente a $40,2 \pm 13,2 \mu\text{g/ml}$ (plasma, $P < 0,005$) y $21,5 \pm 11,2 \text{ ng/ml}$ (BALF, $P < 0,05$). En el caso de montelukast, los niveles de IgE eran mucho menores como $31,4 \pm 14,2 \mu\text{g/ml}$ (plasma, $P < 0,005$) y $3,8 \pm 0,7 \text{ ng/ml}$ (BALF, $P < 0,05$).

50 Para determinar el efecto de verprósido sobre la liberación de citoquinas en los ratones asmáticos inducidos por OVA, los niveles de citoquinas (IL-4 e IL-13) en BALF se midieron utilizando ELISA 48 horas después de la última estimulación. La estimulación con OVA indujo una elevación significativa de las citoquinas a $14,1 \pm 6,1 \text{ pg/ml}$ (IL-4) y $178,5 \pm 96,4 \text{ pg/ml}$ (IL-13) en el BALF en comparación con el control (IL-4, $0,1 \pm 0,5 \text{ pg/ml}$; IL-13, $0,1 \pm 1,0 \text{ pg/ml}$). En el grupo tratado con verprósido, las citoquinas se suprimían significativamente; disminución del $64,5 \pm 27,7\%$ en IL-4 ($P < 0,05$) y del $74,9 \pm 15,5\%$ en IL-13 ($P < 0,005$) respecto a un grupo estimulado con OVA. El Montelukast también mostraba una reducción significativa tanto de IL-4 (disminución del $69,5 \pm 22,0\%$, $P < 0,05$) como de IL-13 (disminución del $84,5 \pm 8,2\%$, $P < 0,05$) respecto al control. Estos resultados demuestran que el verprósido reducía la concentración de IL-4 e IL-13 en BALF del modelo asmático tanto como lo hacía el montelukast (figura 5-C y 5-D).

60 En lo sucesivo en el presente documento, se describirán los métodos de formulación y los tipos de excipientes, pero la presente invención no está limitada a ellos. Los ejemplos de preparación representativos se describieron de la siguiente manera.

Preparación de inyección

Polvo seco del ejemplo 1 o verprósido	100 mg
Metabisulfito sódico	3,0 mg
Metilparabeno	0,8 mg
Propilparabeno	0,1 mg
Agua destilada para inyección	cantidad óptima

5 La preparación de inyección se llevó a cabo disolviendo el componente activo, controlando el pH a aproximadamente 7,5 y a continuación introduciendo todos los componentes en una muestra de 2 ml y esterilizando mediante un método de preparación de inyección convencional.

Preparación de polvo

Polvo seco del ejemplo 1 o verprósido	500 mg
Almidón de maíz	100 mg
Lactosa	100 mg
Talco	10 mg

10 La preparación de polvo se llevó a cabo mezclando los componentes anteriores y llenando un envase sellado.

Preparación de comprimido

Polvo seco del ejemplo 1 o verprósido	200 mg
Almidón de maíz	100 mg
Lactosa	100 mg
Estearato de magnesio	cantidad óptima

15 La preparación de comprimido se llevó a cabo mezclando los componentes anteriores y formando un comprimido.

Preparación de cápsula

Polvo seco del ejemplo 1 o verprósido	100 mg
Lactosa	50 mg
Almidón de maíz	50 mg
Talco	2 mg
Estearato de magnesio	cantidad óptima

20 La preparación de comprimido se llevó a cabo mezclando los componentes anteriores y llenando una cápsula de gelatina mediante un método de preparación de gelatina convencional.

Preparación de líquido

Polvo seco del ejemplo 1 o verprósido	1000 mg
Azúcar	20 g
Polisacárido	20 g
Aroma de limón	20 g

25 La preparación de líquido se llevó a cabo disolviendo el componente activo, y a continuación introduciendo los componentes en una muestra de 1000 ml y esterilizando mediante un método de preparación de líquido convencional

30

Preparación de alimento natural

Polvo seco del ejemplo 1 o verprósido	1000 mg
Mezcla de vitaminas	cantidad óptima
Acetato de Vitamina A	70 µg
Vitamina E	1,0 mg
Vitamina B ₁	0,13 mg
Vitamina B ₂	0,15 mg
Vitamina B6	0,5 mg
Vitamina B12	0,2 mg
Vitamina C	10 mg
Biotina	10 µg
Amida de ácido nicotínico	1,7 mg
Ácido fólico	50 µg

Ácido calcio-pantoténico	0,5 mg
Mezcla mineral	cantidad óptima
Sulfato ferroso	1,75 mg
Óxido de zinc	0,82 mg
Carbonato de magnesio	25,3 mg
Fosfato monopotásico	15 mg
Fosfato dicálcico	55 mg
Citrato potásico	90 mg
Carbonato cálcico	100 mg
Cloruro de magnesio	24,8 mg

Las mezclas de vitaminas y mineral mencionadas anteriormente pueden modificarse de muchas maneras. Dichas variaciones no deben contemplarse como un alejamiento del espíritu y alcance de la presente invención.

5 Preparación de bebida natural

Polvo seco del ejemplo 1 o verprósido	1000 mg
Ácido cítrico	1000 mg
Oligosacárido	100 g
Concentración de albaricoque	2 g
Taurina	1 g
Agua destilada	900 ml

10 La preparación de bebida natural se llevó a cabo disolviendo el componente activo, mezclando con agitación a 85°C durante 1 hora, se filtró y a continuación introduciendo todos los componentes en una muestra de 1000 ml y esterilizando mediante un método de preparación de bebida natural convencional.

15 Habiéndose descrito la presente invención de esta manera, será obvio que la misma puede modificarse de muchas maneras. Dichas variaciones no deben contemplarse como un alejamiento del espíritu y alcance de la presente invención, y todas dichas modificaciones, como sería obvio para un experto en la materia, pretenden estar incluidas dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Aplicabilidad industrial

20 Tal como se ha descrito en la presente invención, el extracto de *P. longifolium* y los derivados de catalpol aislados a partir de éste muestran la supresión de niveles elevados de IgE, IL-4 e IL-13 y eosinofilia en plasma y BALF, y la sobreproducción de mucosidad en los tejidos pulmonares utilizando el modelo de ratón asmático inducido por OVA. Por lo tanto, puede utilizarse como alimento terapéutico o natural funcional para tratar y prevenir una enfermedad inflamatoria, alérgica y asmática.

25

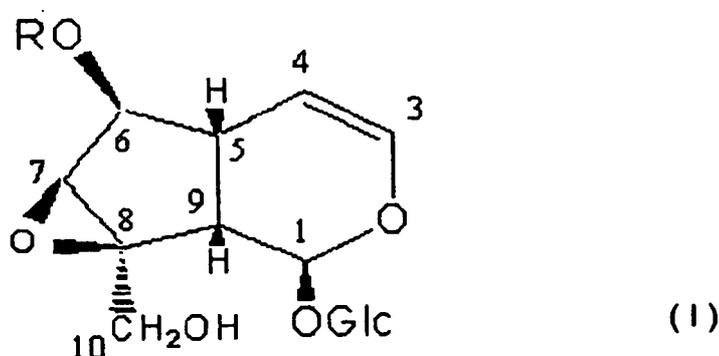
REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende un extracto impuro o extracto soluble en disolvente orgánico de una planta del género *Pseudolysimachion* como ingrediente activo para el tratamiento y la prevención de una enfermedad inflamatoria, alérgica y asmática.

2. Composición farmacéutica, según la reivindicación 1, en la que dicho extracto impuro o extracto soluble en disolvente orgánico se extrae con el disolvente seleccionado del grupo que comprende agua, alcoholes inferiores, acetona, acetato de etilo, cloroformo, diclorometano o sus mezclas.

3. Composición farmacéutica, según la reivindicación 1, en la que dicho extracto se extrae de *P. longifolium*, *P. ovutum*, *P. kiusianum*, *P. kiusianum* var. *diamanticum*, *P. kiusianum* var. *villosum*, *P. dahuricum*, *P. pyrethrinum*, *P. linarifolium*, *P. linarifolium* var. *villosulum*, *P. rotundum* var. *subintegrum*, *P. rotundum* var. *coreanum*, *P. insulare* o *P. undulate*.

4. Composición farmacéutica que comprende derivados de catalpol representados mediante la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, como ingrediente activo para el tratamiento y la prevención de una enfermedad inflamatoria, alérgica y asmática:



en la que,

R es independientemente, como mínimo, un grupo seleccionado entre un átomo de hidrógeno, 3,4-dihidroxibenzoilo, 3-hidroxi-4-metoxibenzoilo, 4-hidroxibenzoilo, 3,4-dimetoxibenzoilo, o grupo cinamoilo sustituido con 3,4-dihidroxi, 3-hidroxi-4-metoxi, grupo alquilo inferior C₁-C₃ o grupo alcoxi inferior C₁-C₃.

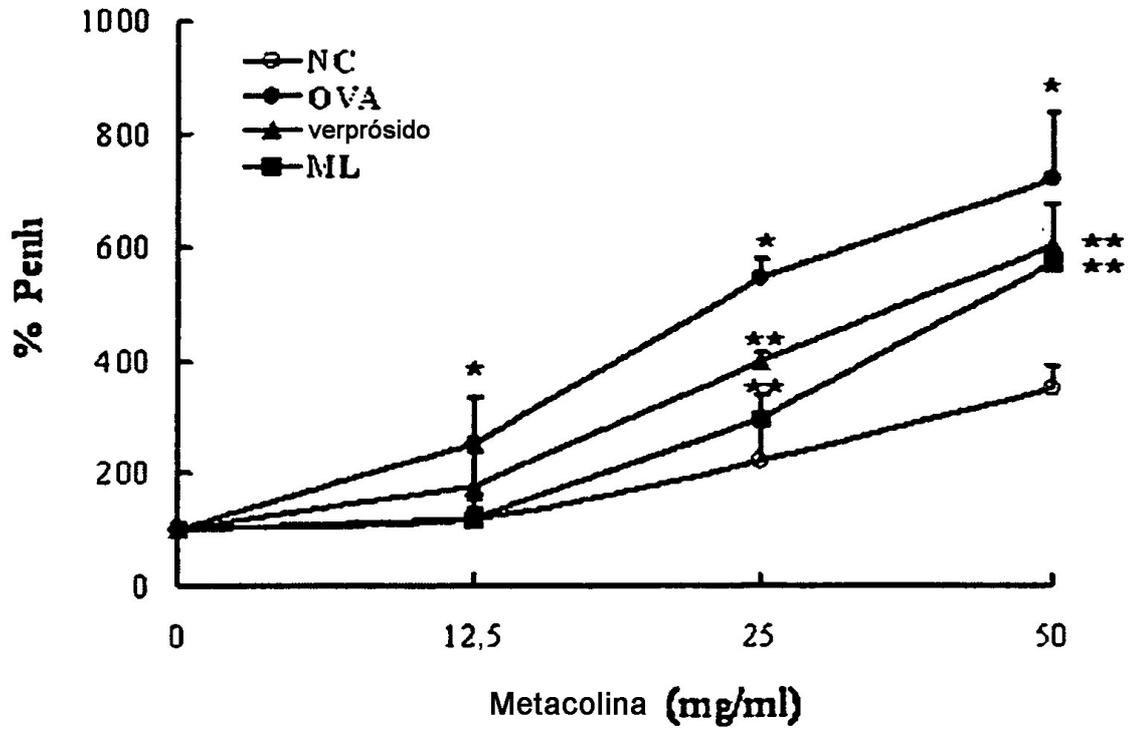
5. Extracto impuro o extracto soluble en disolvente orgánico de una planta del género *Pseudolysimachion*, según la reivindicación 1, o los derivados de catalpol, según la reivindicación 4, para tratar o prevenir una enfermedad inflamatoria, alérgica y asmática.

6. Medicamento para tratar o prevenir una enfermedad inflamatoria, alérgica y asmática que comprende un extracto impuro o extracto soluble en disolvente orgánico de una planta del género *Pseudolysimachion*, según la reivindicación 1, o los derivados de catalpol, según la reivindicación 4.

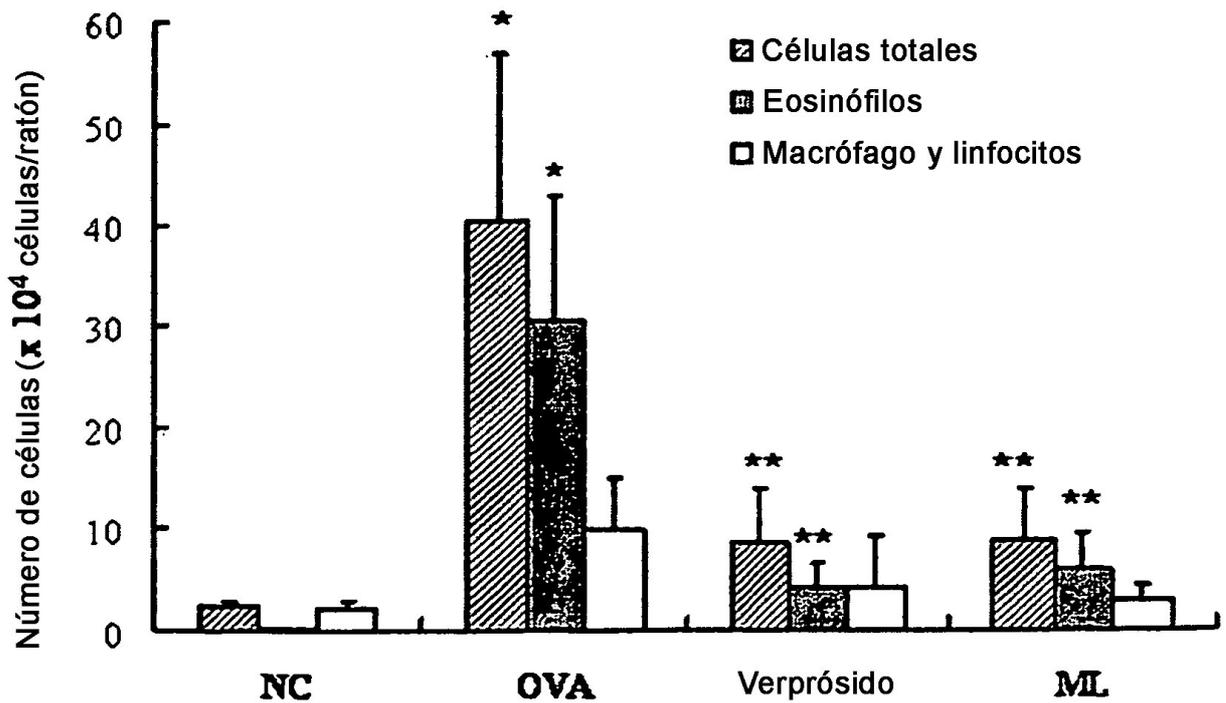
7. Alimento natural funcional que comprende un extracto impuro o extracto soluble en disolvente orgánico de una planta del género *Pseudolysimachion*, según la reivindicación 1, o los derivados de catalpol, según la reivindicación 4, junto con un aditivo sitiológicamente aceptable para la prevención y la mejoría de una enfermedad inflamatoria, alérgica y asmática.

8. Alimento natural funcional, según la reivindicación 7, en el que dicho alimento natural se proporciona en forma de píldora, polvo, gránulo, comprimido, comprimido masticable, cápsula o tipo de bebida.

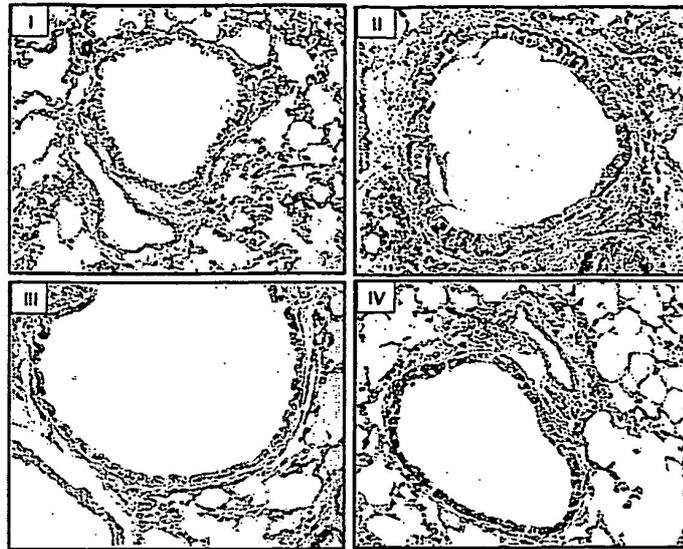
[Fig. 1]



[Fig. 2]



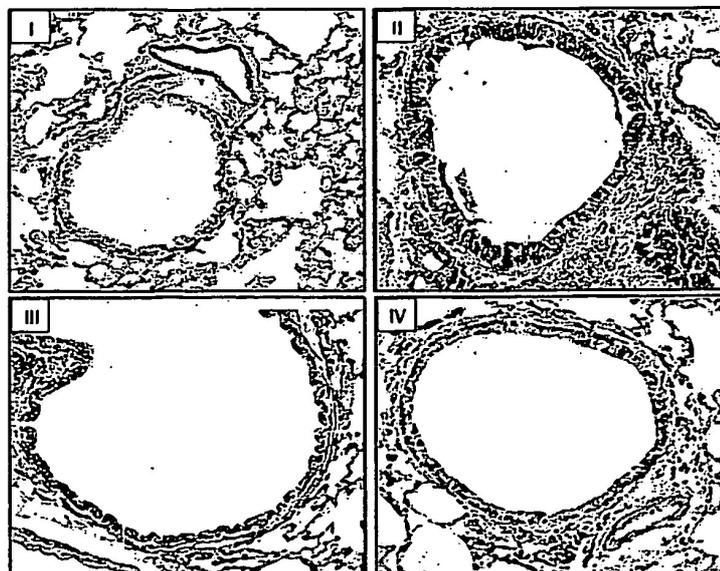
[Fig. 3]



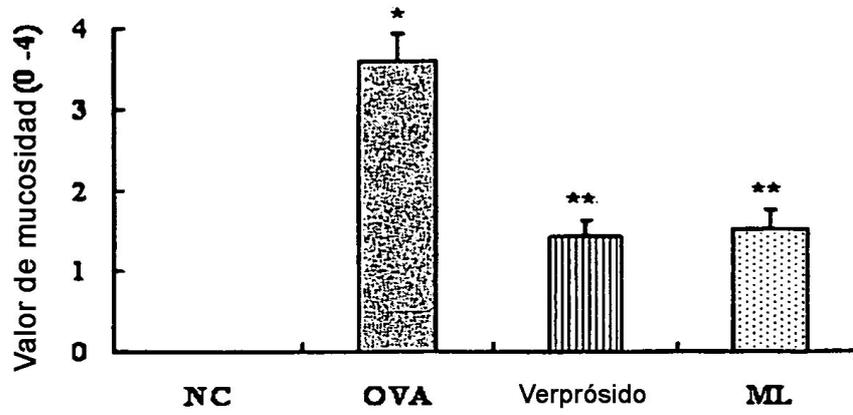
[Fig. 3-V]



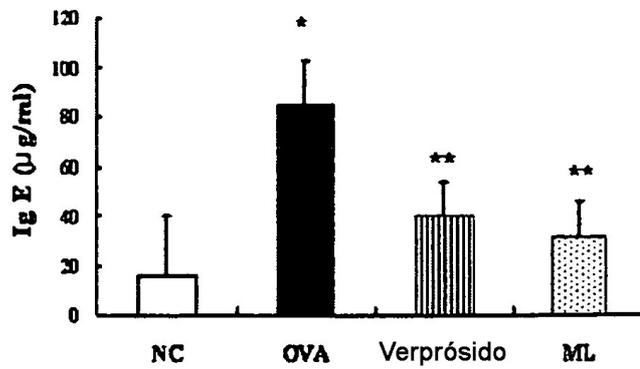
[Fig. 4-A]



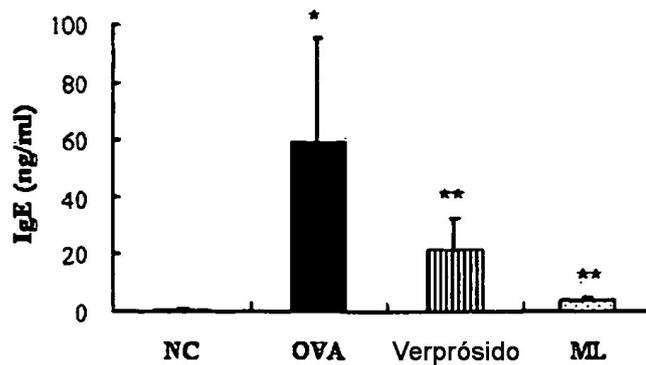
[Fig. 4-B]



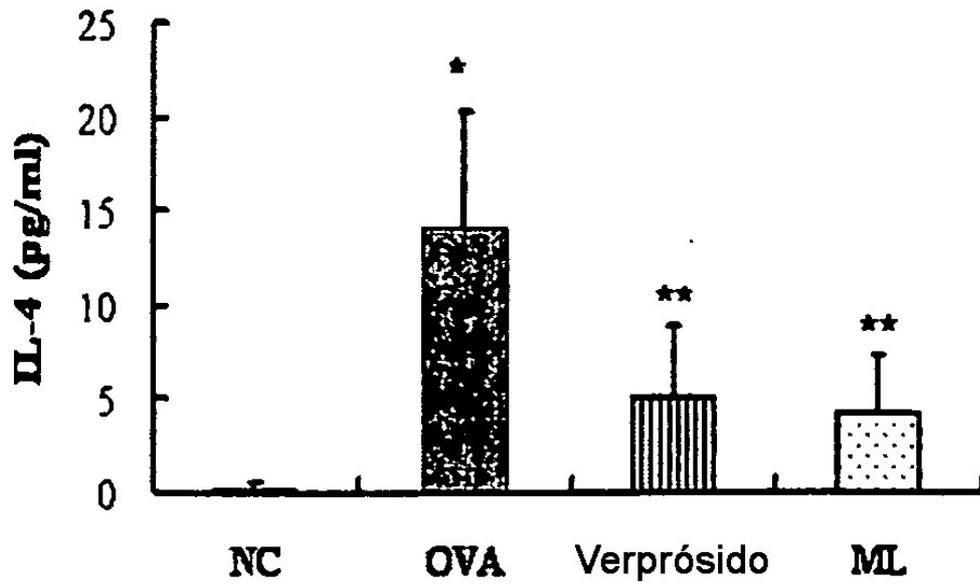
[Fig. 5-A]



[Fig. 5-B]



[Fig. 5-C]



[Fig. 5-D]

