

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 450 417**

51 Int. Cl.:

A61K 36/233	(2006.01)	A61P 1/00	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)		
A61P 37/00	(2006.01)		
A61P 37/06	(2006.01)		
A61P 37/08	(2006.01)		
A61P 17/00	(2006.01)		
A61P 27/00	(2006.01)		
A61P 9/00	(2006.01)		
A61P 11/00	(2006.01)		
A61P 11/06	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2010 E 10168143 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013 EP 2402020**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende extractos de Bupleurum krylovianum para su uso en el tratamiento de artritis y artritis reumatoide**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.03.2014

73 Titular/es:
**INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH
INSTITUTE (100.0%)
No. 195, Sec. 4, Chung Hsing Road, Chutung
Hsinchu 31040, TW**

72 Inventor/es:
**SHIH, YING-CHU;
LEE, LAIN-TZE;
 TSAI, BIE-SHUNG;
 LO, JIR-MEHNG;
 TONG, TIEN-SOUNG;
 SHEU, JENN-LINE;
 HUANG, KUO-KUEI;
 TSAI, YING-FEI;
 LEE, YI-CHING;
 LIANG, HUI-JU;
 YEN, JUI-HUNG y
 LEE, CHENG-YU**

74 Agente/Representante:
CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 450 417 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica que comprende extractos de *Bupleurum krylovianum* para su uso en el tratamiento de artritis y artritis reumatoide.

Antecedentes

5 Campo técnico

La presente memoria descriptiva se refiere a una composición farmacéutica con una función inmunomoduladora, y en particular se refiere a un extracto de *Bupleurum* con una función inmunomoduladora.

Descripción de la técnica relacionada

10 El mecanismo para los trastornos inmunitarios se ha informado en varios estudios. Muchos estudios indican que el factor de necrosis tumoral (TNF- α) expresado en exceso está relacionado con enfermedades inmunoinflamatorias tales como artritis reumatoide (AR), enfermedad de Crohn, artritis psoriásica o espondilitis anquilosante.

15 El TNF- α funciona como citocinas, modula el reclutamiento de células, proliferación celular, muerte celular y regulación inmune. A bajas concentraciones en tejidos, el TNF- α puede aumentar los mecanismos de defensa del huésped contra infección. A altas concentraciones, el TNF- α produce inflamación en exceso conduciendo a lesiones a los órganos. Así, Brennan y col. informaron de que la eliminación de TNF en exceso de los sitios de inflamación puede tratar los trastornos inmunitarios producidos por respuestas inflamatorias (Brennan y col., 1989, Inhibitory effect of TNF- α antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. Lancet 2, 244-247).

20 Feldmann y col. informaron de que TNF desempeña una función particularmente importante en la regulación de una cascada de eventos patógenos en AR, enfermedad de Crohn, psoriasis y otras enfermedades, ejemplificado por la rápida inducción de citocinas, tales como IL-1 β y IL-6 (Feldmann y col., 2002, Discovery of TNF- α as a therapeutic target in rheumatoid arthritis: preclinical and clinical studies. Joint Bone Spine 69, 12-18). TNF se expresa en exceso particularmente en modelos animales de AR (Keffer y col., 1991, Transgenic mice expressing human tumor necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. EMBO J 10, 4025-4031). Se ha sugerido que una espectacular reducción en las concentraciones de IL-6 en suero producida en el plazo de 1 día de terapia de infliximab fue un efecto directo de la neutralización de TNF (Charles y col., 1999, Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF- α therapy in rheumatoid arthritis. J Immunol 163, 1521-1528).

30 Se han producido muchos agentes biológicos con inhibición de TNF- α , tales como adalimumab, etanercept, infliximab, DMARD (por ejemplo, metotrexato) o AINE. Debido a la rápida eficacia del fármaco, espectaculares efectos y buena tolerancia inmune, estos agentes biológicos se han convertido en productos comerciales convencionales. Sin embargo, los agentes biológicos son caros, requiriendo administración intravenosa y tienen efectos adversos, tales como riesgos de inducir respuestas inmunitarias no deseadas o infección. Es desafiante el desarrollo de un fármaco que es seguro para el sistema inmunitario.

35 *Bupleurum* es un género de plantas usado en la medicina china para reducir fiebre, aliviar dolor, eliminar toxinas y reducir inflamación. En la medicina china, *Bupleurum* trata principalmente saciedad y malestar en el pecho, amargor en la boca, sequedad en la garganta, crisis alternas de escalofrío y fiebre, ictericia, hepatitis, enterogastritis y colecistitis. La raíz de *Bupleurum* se usa normalmente. Se ha informado que saikosaponina, longispinogenina, esteroides, aceite de lípidos, isoflavonas y azúcares se aislaron de la raíz de una planta de *Bupleurum*, y se determinó la saikosaponina como el principal componente. Se ha demostrado que la saikosaponina a y d tienen efectos medicinales (Liu S.U., y col., Development Diversity of *Bupleurum*, Journal of Agricultural Research of China, v. 53, n° 2 (junio de 2004)).

45 *Bupleurum* se ha estudiado entusiásticamente para la hepatitis. Sin embargo, no hay estudio o revista publicada que implemente la aplicación de *Bupleurum* a la inmunomodulación. Los inventores han estudiado la extracción de *Bupleurum*, en el que se identificó el principio activo del extracto, y se determinó la relación entre el principio activo y TNF- α o IL-6 *in vivo*. Finalmente, se ha desarrollado una novedosa composición farmacéutica con inmunomodulación.

Resumen

Se facilita una descripción detallada con referencia a los dibujos adjuntos.

La presente descripción proporciona una composición farmacéutica con una función inmunomoduladora que comprende un extracto de *Bupleurum* obtenido moliendo *Bupleurum*, añadiendo *Bupleurum* molido a un disolvente y

5 aislando el extracto del disolvente, en el que *Bupleurum* comprende *Bupleurum krylovianum*, *Bupleurum longiradiatum*, *Bupleurum smithii*, *Bupleurum pusillum*, *Bupleurum longicaule*, *Bupleurum salicifolium*, *Bupleurum scorzonerifolium* y *Bupleurum* con al menos una de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de un grupo que consiste en SEC ID N° 1-6 y una secuencia de nucleótidos con no más del 1 % de las divergencias de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 1-6, o combinaciones de las mismas.

También se proporciona una composición farmacéutica con una función inmunomoduladora que comprende cariofilina o isómero cis como principio activo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 La presente divulgación puede entenderse más completamente por la lectura de la posterior descripción detallada y ejemplos con referencias hechas a los dibujos adjuntos, en los que:

La Fig. 1 es un cromatograma de HPLC de los extractos de *Bupleurum* por una disolución acuosa al 95 % de etanol.

La Fig. 2 es un cromatograma de HPLC del extracto de *Bupleurum krylovianum* por una disolución acuosa al 95 % de etanol.

15 La Fig. 3a es un espectro de RMN ¹H del cristal (1) en el Ejemplo 3, y la Fig. 3b muestra un espectro de RMN ¹H del cristal (2) en el Ejemplo 3.

La Fig. 4a es un cromatograma de HPLC de cariofilina, y la Fig. 4b muestra un cromatograma de HPLC de isocariofilina.

La Fig. 5 es la inhibición de TNF- α en un modelo animal inflamatorio inducido por LPS por diferentes cantidades del extracto de etanol de *Bupleurum*.

20 La Fig. 6 es la inhibición de IL-6 en un modelo animal inflamatorio inducido por LPS por las cantidades del extracto de etanol de *Bupleurum*.

La Fig. 7 es la inhibición de TNF- α en un modelo animal inflamatorio inducido por LPS por el extracto de etanol de *Bupleurum* con el tiempo.

25 La Fig. 8 es la inhibición de IL-6 en un modelo animal inflamatorio inducido por LPS por el extracto de etanol de *Bupleurum* con el tiempo.

La Fig. 9 es la inhibición de edema de la pata trasera en un modelo animal de edema de la pata trasera inducido por carragenina por el extracto de etanol de *Bupleurum*.

La Fig. 10 es la inhibición de artritis en un modelo animal de artritis inducida por adyuvante por el extracto de etanol de *Bupleurum*.

30 La Fig. 11 es la inhibición de artritis en un modelo animal de artritis inducida por colágeno por el extracto de etanol de *Bupleurum*.

La Fig. 12 es la inhibición de TNF- α en una línea celular U937 por cariofilina.

La Fig. 13 es la inhibición de TNF- α en una línea celular U937 por isocariofilina.

La Fig. 14 es la inhibición de IL-6 en una línea celular U937 por cariofilina.

35 La Fig. 15 es la inhibición de IL-6 en una línea celular U937 por isocariofilina.

Descripción detallada

40 La invención proporciona el uso de un extracto de *B. krylovianum* en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de artritis o artritis reumatoide, en el que el extracto de *B. krylovianum* se obtiene moliendo *Bupleurum krylovianum*, añadiendo el *Bupleurum krylovianum* molido a una disolución acuosa de etanol y aislando el extracto del disolvente.

Específicamente, *Bupleurum* comprende *Bupleurum krylovianum*.

Mientras que algunas plantas medicinales son abundantes, otras no. Las plantas medicinales con morfología o nombres similares algunas veces producen confusión, intercambiándose. La identificación tradicional de plantas medicinales requiere de un experto que considere la morfología de la planta, y sabor, y que realice examen microscópico. Una vez las plantas muestran morfología similar o pierden su sabor original, normalmente son indistinguibles, pudiendo conducir a baja eficacia medicinal o envenenar. Por tanto, *Bupleurum* se identifica por polimorfismo de ADN cromosómico y divergencia de secuencias de nucleótidos del espaciador transcrito interno (ITS) de ARN ribosómico (ARNr). Así, *Bupleurum* comprende *Bupleurum* con una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que consiste en: SEC ID N° 1-6 y una secuencia de nucleótidos con no más del 1 % de las divergencias de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 1-6.

Bupleurum puede extraerse de la raíz de una planta o una planta entera. La "extracción" según la invención puede ser extracción con disolvente. La "extracción con disolvente" se refiere a un procedimiento que comprende: añadir un sustrato de interés a un disolvente adecuado y extraer un compuesto diana basándose en la solubilidad de componentes del sustrato en el disolvente. En un ejemplo, *Bupleurum* se muele y se sumerge en un disolvente bajo temperatura ambiente durante un periodo de tiempo. El disolvente se aísla y se seca bajo temperatura ambiente obteniéndose un extracto de *Bupleurum*. En otro ejemplo, el *Bupleurum* molido se añade a un disolvente polar y se extrae después de calentar a reflujo.

El disolvente usado en la invención puede ser alcoholes C₁~C₁₂, acetatos C₂~C₅, alcanos C₅~C₆, o combinaciones de los mismos, tales como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, alcohol 2-butílico, alcohol terc-butílico, 1,3-butanodiol, 1,4-butanodiol, pentanol, isopentanol, 2,3-pentanodiol, 2,4-pentanodiol, ciclopentanol, hexanol, ciclohexanol, heptanol, octanol, nonanol, decanol, undecanol, dodecanol, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de pentilo, pentano, ciclopentano, hexano, ciclohexano, o combinaciones de los mismos, pero no se limitan a éstos. En un ejemplo se usa etanol, acetato de etilo y/o pentano como disolvente para la extracción. En otro ejemplo se usa una disolución acuosa de etanol como disolvente para la extracción. La concentración de etanol puede ser del 20 %-95 %, preferentemente del 50 %~75 % basado en la disolución acuosa de etanol.

El volumen de disolvente puede ser superior a 5 veces al de *Bupleurum*, o preferentemente 5~10 veces.

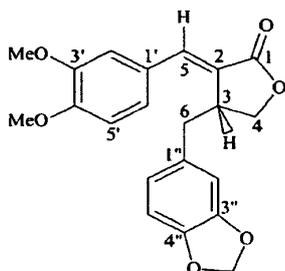
La extracción es normalmente superior a 2 horas, preferentemente 2~24 horas, más preferentemente 4~5 horas.

La extracción es normalmente bajo temperatura ambiente, preferentemente bajo temperatura ambiente a la temperatura de ebullición de la disolución acuosa de etanol, más preferentemente bajo la temperatura de ebullición de la disolución acuosa de etanol.

La extracción puede comprender además un procedimiento de concentración para concentrar y secar el extracto después de calentar a reflujo, obteniéndose un sólido o cristal. La extracción puede repetirse varias veces obteniéndose un extracto puro.

El extracto de *Bupleurum* muestra actividades para inhibir la expresión de TNF- α o IL-6 *in vivo*, como se muestra en los siguientes ejemplos, presentando función inmunomoduladora.

El extracto de *Bupleurum* puede aislarse adicionalmente, tal como por recristalización. La cariofilina e isómero cis han sido aislados de *Bupleurum*. La cariofilina se conoce como una de las ligninas, que es trans-(3,4-dimetoxibenciliden)- β -(3,4-metilendioxilbencil)- γ -butirolactona, C₂₂H₂₂O₇, como se presenta en la fórmula (1). La cariofilina normalmente forma cristales aciculares transparentes a temperatura ambiente y tiene un punto de fusión de 131 °C~132 °C.



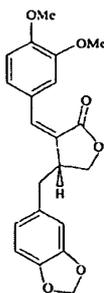
40

Fórmula (1)

La extracción e identificación de cariofilina de *Bupleurum* se ha descrito en publicaciones tales como Dou HS y col. (2000) Studies on method for the determination of kaerophyllin in *Bupleurum smithii* wolff Wolff var. *parvifolium*,

China Journal of Chinese Materia Medica. 2000 Aug;25(8):488-9; Shang-Ming Yuan y col., (2000) Analysis of kaerophyllin in 4 kinds of Saiko by HPLC, Northwest Pharmaceutical Journal. 2000 15(04); Estevez-Braun A. y col., 1994, Antibiotic activity and absolute configuration of 8S-Heptadeca-2(Z),9(Z)-diene-4,6-diyne-1,8-diol from *Bupleurum salicifolium*, J. Natural Products, 57, 1178-1182; y Estevez-Braun A. y col., 1995, Busaliol and Busalicifol, two new tetrahydrofuran lignans from *Bupleurum salicifolium*, J. Natural Products, 58, 887-892.

Se ha descubierto que la cariofilina existe frecuentemente en una mezcla con isómero cis. El isómero cis de cariofilina es un cristal cuadrado transparente con un punto de fusión de 146,5 °C - 148 °C, que es cis-(3,4-dimetoxibenciliden)-β-(3,4-metilendioxilbencil)-γ-butirolactona, C₂₂H₂₂O₇, como se presenta en la fórmula (2).



10

Fórmula (2)

Actualmente no hay referencias que demuestren que la cariofilina y el isómero cis tienen funciones biológicas. Sin embargo, en los siguientes ejemplos, la cariofilina y el isómero cis muestran un efecto sobre la expresión de TNF-α o IL-6 *in vivo*. Por tanto, la cariofilina y el isómero cis tienen una función inmunomoduladora *in vivo*.

15

20

25

Por tanto, la composición farmacéutica con inmunomodulación puede aplicarse para tratar, aliviar o prevenir trastornos o síntomas relacionados con la función de TNF-α o IL-6, tales como choque séptico, septicemia, reperfusión isquémica, infección micobacteriana, meningitis, psoriasis, insuficiencia cardíaca congestiva, caquexia, rechazo de trasplante, linfoma de linfocitos T cutáneo, angiogénesis, trastornos autoinmunitarios, dermatitis, enfermedad de Crohn, colitis, osteoartritis y artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, enfermedad de Still del adulto, uveítis, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Behcet, síndrome de Sjogren, sarcoidosis, polimiositis, dermatomiositis, esclerosis múltiple, ciática, enfermedad periodontal, síndrome de inmunodeficiencia del adulto, diabetes no mellitus dependiente de insulina (DNMDI), lupus eritematoso sistémico (LES), glaucoma, fibrosis pulmonar idiopática (FPI), displasia broncopulmonar, retinopatía, esclerosis sistémica, osteoporosis, isquemia renal, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular isquémico, nefritis, hepatitis, glomerulonefritis, dermatitis atópica, vasculitis, alergia, rinitis alérgica estacional, obstrucción reversible de las vías respiratorias, síndrome disneico del adulto, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquitis, o combinaciones de las mismas, pero no se limitan a éstas.

La composición farmacéutica puede comprender además vehículos y/o aditivos farmacéuticamente aceptables en un porcentaje apropiado, que es muy conocido en la técnica.

30

La composición farmacéutica puede administrarse intravenosamente, intramuscularmente, por vía oral o subcutáneamente, y preferentemente por vía oral. La administración puede realizarse en múltiples dosificaciones durante un periodo de tiempo. La pauta puede diseñarse según pruebas farmacéuticas.

[Ejemplo 1] Análisis de HPLC de *Bupleurum*

35

Se molieron las raíces de varias especies de *Bupleurum*. Porciones de 0,5 g de *Bupleurum* molido se añadieron individualmente a 25 ml de una disolución acuosa al 95 % de etanol y se vibraron durante la noche. Después de concentrarse y secarse se añadió disolución al 95 % de etanol para preparar un volumen final de 2 ml. La disolución se analizó bajo análisis de cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Análisis de HPLC:

Columna: SymmetryShield™ (Waters), RP18, 5 μm, 250 x 4,6 mm de DI
Fase móvil: A: H₂O, B: acetonitrilo, C: metanol.

40

Detección: UV/ λ = 237 nm.

Se seleccionó el cromatograma de HPLC con el pico de cariofilina (patrón, línea (a) en la Fig. 1), en el que la línea (b) es de *Bupleurum* con una secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 1 (la secuenciación se describe en el Ejemplo 18), la línea (c) es de *Bupleurum krylovianum* con una secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 2, la línea (d) es de *Bupleurum longiradiatum* con una secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 3, la línea (e) es de *Bupleurum* con una secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 4, la línea (f) es de *Bupleurum* con una secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 5 y la línea (g) es de *Bupleurum* con una secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 6.

[Ejemplo 2] Extracción de *Bupleurum krylovianum*

Se añadieron 2 kg de *Bupleurum krylovianum* molido seleccionado en el Ejemplo 1 a 16 l de una disolución acuosa al 95 % de etanol. Después de 5 horas a temperatura ambiente, la disolución se concentró obteniéndose un extracto con un rendimiento de extracción del $6,7 \pm 0,1$ %. El extracto se analizó entonces bajo análisis de HPLC. El cromatograma resultante muestra picos entre 30-40 minutos (Fig. 2).

Análisis de HPLC:

Columna: SymmetryShield™ (Waters), RP18, 5 μ m, 250 x 4,6 mm de DI
 Fase móvil: A: H₂O, B: acetonitrilo, C: metanol.
 Detección: UV/ λ = 237 nm.

[Ejemplo 3] Identificación de principios activos

Se añadieron 18,5 kg de *Bupleurum krylovianum* molido seleccionado en el Ejemplo 1 a 25 l de metanol. Después de 4 horas bajo temperatura ambiente, la disolución se secó y se concentró obteniéndose 18,5 kg de residuos. Se purificaron 500 mg de los residuos usando cromatografía en columna (fase estacionaria: SiO₂, fase móvil: hexano, acetato de etilo y metanol con relación de 6/4/1, 3/2/1 y 0/0/1) y los eluatos se recogieron por separado. Cada eluato se fraccionó por cromatografía en capa fina (CCF) y se recogieron 12 fracciones, respectivamente. Cada una de las 12 fracciones se añadió a metanol para hacer una concentración final de 1 mg/ml y se analizó por el análisis de HPLC del Ejemplo 1. Se seleccionó un cromatograma con el pico de cariofilina (patrón). La fracción seleccionada se purificó adicionalmente por cromatografía en columna y se aisló un extracto con mayor pureza. El extracto se cristalizó adicionalmente obteniéndose cristales transparentes blancos (1).

El cristal (1) se estudió por RMN ¹H, RMN ¹³C y espectroscopía EM. Como muestra el resultado en la Tabla 1, Tabla 2 y Fig. 3a, hubo desplazamientos químicos a 6-8 ppm y 2,5-4 ppm, sugiriendo que había ligninas C₃ y C₆. Comparando la información de la cariofilina descrita en Wen-Liang C. y col., 2003, Immunosuppressive flavones and lignans from *Bupleurum scorzoniferifolium*, Phytochemistry 64, 1375-1379, el cristal (1) se identificó como cariofilina.

[Tabla 1] Datos de RMN ¹H de cariofilina en Wen-Liang C. y col. y el cristal (1) del Ejemplo 3

Localización	δ H mult de cariofilina en Wen-Liang C. y col.	δ H mult del cristal (1) del Ejemplo 3
3	3,78m	3,78
4 α	4,24m	4,24
4 β	4,24m	4,24
5	7,50s	7,51
6 α	2,58dd (14,4, 10,3)	2,59
6 β	3,01dd (14,4,4,1)	3,01
2'	7,02d (1,5)	7,03
5'	6,91d (8,4)	6,91
6'	7,19dd (8,4, 1,5)	7,19
2''	6,62d (1,5)	6,61
5''	6,69d (7,8)	6,67
6''	6,59dd (7,8, 1,5)	6,60
3'-OMe	3,88s	3,88
4'-OMe	3,91s	3,92
OCH ₂ O	5,90d (1,5)	5,90

[Tabla 2] Datos de RMN ^{13}C (CDCl_3) de cariofilina en Wen-Liang C. y col. y el cristal (1) del Ejemplo 3

Localización	δC de cariofilina en Wen-Liang C. y col.	δC del cristal (1) del Ejemplo 3
1	172,56	172,57
2	125,58	125,73
3	39,60	39,72
4	69,46	69,53
5	137,39	137,43
6	37,53	37,50
1'	126,82	126,97
2'	112,87	113,06
3'	150,65	150,80
4'	149,05	149,21
5'	111,25	111,40
6'	123,54	123,54
1''	131,43	131,54
2''	108,91	109,06
3''	147,91	148,03
4''	146,49	146,61
5''	108,41	108,50
6''	121,89	121,97
3'-OMe	55,93	56,05
4'-OMe	55,96	56,05
OCH ₂ O	101,02	101,10

La fracción seleccionada en el Ejemplo 3 se recrystalizó en hexano obteniéndose cristales cuadrados transparentes (2). El cristal se estudió por RMN ^1H , RMN ^{13}C y espectroscopía EM y los resultados se muestran en la Tabla 3, Tabla 4 y Fig. 3b. Comparando la información de la isocariofilina descrita en Wen-Liang C. y col., 2003, Immunosuppressive flavones and lignans from *Bupleurum scorzonerifolium*, *Phytochemistry* 64, 1375-1379, se identificó que el cristal (2) era isocariofilina.

[Tabla 3] Datos de RMN ^1H de isocariofilina en Wen-Liang C. y col. y el cristal (2) del Ejemplo 3

Localización	δH mult de isocariofilina en Wen-Liang C. y col.	δH mult del cristal (2) del Ejemplo 3
3	3,28m	3,28
4 α	4,09	4,09
4 β	4,30m	4,3
5	6,61s	6,61
6 α	2,77dd	2,76
6 β	2,92dd	2,92
2'	8,07d	8,07
5'	6,82d	6,81
6'	7,15dd	7,14
2''	6,68d	6,67
5''	6,74d	6,74
6''	6,62dd	6,61
3'-OMe	3,89s	3,89

(continuación)

Localización	δH mult de isocariofilina en Wen-Liang C. y col.	δH mult del cristal (2) del Ejemplo 3
4'-OMe	3,92s	3,91
OCH ₂ O	5,93d	5,93

[Tabla 4] Datos de RMN ¹³C (CDCl₃) de isocariofilina y el cristal (2) del Ejemplo 3

Localización	δC de isocariofilina en Wen-Liang C. y col.	δC del cristal (2) del Ejemplo 3
1	172,56	172,57
2	125,58	125,73
3	39,6	39,72
4	69,46	69,53
5	137,39	137,43
6	37,53	37,6
1'	126,82	126,97
2'	112,87	113,06
3'	150,65	150,8
4'	149,05	149,21
5'	111,25	111,4
6'	123,54	123,54
1''	131,43	131,54
2''	108,91	109,06
3''	147,91	148,03
4''	146,49	146,61
5''	108,41	108,5
6''	121,89	121,97
3'-OMe	55,93	56,05
4'-OMe	55,96	56,05
OCH ₂ O	101,02	101,1

- 5 El cristal blanco (1) y el cristal cuadrado transparente (2) del Ejemplo 3 se estudiaron bajo análisis de HPLC, que comprendía:

Columna: ODS 3V,
Fase móvil: CH₃OH/H₂O (0,1 % de H₃PO₄), elución en gradiente,
Velocidad de flujo: 1,0 ml/min, y

- 10 Detección: UV/ λ = 310 nm.

Los cromatogramas resultantes mostraron que el cristal blanco (1) (cariofilina) tenía un pico a aproximadamente 37 minutos (Fig. 4a) y el cristal cuadrado transparente (2) (isocariofilina) tenía un pico a aproximadamente 40 minutos (Fig. 4b).

[Ejemplo 4] Inhibición de los extractos por diferentes concentraciones de extractos de etanol

- 15 200 g de *Bupleurum krylovianum* molido seleccionado en el Ejemplo 1 se dividieron igualmente y se añadieron a cuatro matraces redondos de 1 l. A cada matraz se añadieron disoluciones acuosas de etanol con concentraciones del 20 %, 50 %, 75 % y 95 %, individualmente. Después de calentar a reflujo durante 2 horas, cada una de las disoluciones se secó y se concentró obteniéndose extractos.

- 20 Ratones BALB/c se alimentaron con los extractos en una cantidad de 500 mg/kg, respectivamente. Después de 2 horas, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 1 mg/kg de lipopolisacárido (LPS) en solución salina

tamponada con fosfato (PBS). La sangre se recogió después de 1,5 horas. La concentración de TNF- α y IL-6 en el suero de ratones se cuantificó por ELISA (R&D System®). Las tasas de inhibición (%) de TNF- α y IL-6 en el suero se calcularon basándose en la concentración de TNF- α y IL-6 en el suero antes de que los ratones se alimentaran con los extractos. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

5

[Tabla 5]

Concentración de etanol para la extracción	Inhibición de TNF- α (%)	Inhibición de IL-6 (%)
25 %	57,7	26,2
50 %	92,8	81,7
75 %	92,4	74,0
95 %	71,4	40,3

[Ejemplo 5] Inhibición de los extractos por diferentes extracciones con disolvente

(i) Extracción por 50 % de etanol: 50 g de *Bupleurum krylovianum* molido seleccionado en el Ejemplo 1 y 500 ml de disolución acuosa al 50 % de etanol se añadieron a un matraz redondo de 1 l. Después de calentar a reflujo durante 2 horas, la disolución se secó y se concentró obteniéndose un extracto (a). El extracto (a) se usó en los siguientes experimentos *in vivo*.

10

(ii) Extracción por hexano: 50 g de *Bupleurum krylovianum* molido seleccionado en el Ejemplo 1 y 500 ml de disolución acuosa al 50 % de etanol se añadieron a un matraz redondo de 1 l. El matraz se calentó a reflujo durante 2 horas y se añadió 100 % de hexano en una cantidad igual de la disolución en el matraz. La etapa se repitió tres veces. La disolución en el matraz se secó y se concentró obteniéndose un extracto (b). El extracto (b) se usó en los siguientes experimentos *in vivo*.

15

(iii) Extracción por acetato de etilo: 50 g de *Bupleurum krylovianum* molido seleccionado en el Ejemplo 1 y 500 ml de disolución acuosa al 50 % de etanol se añadieron a un matraz redondo de 1 l. El matraz se calentó a reflujo durante 2 horas y se añadió acetato de etilo en una cantidad igual de la disolución en el matraz. La etapa se repitió tres veces. La disolución en el matraz se secó y se concentró obteniéndose un extracto (c). El extracto (c) se usó en los siguientes experimentos *in vivo*.

20

(iv) Experimentos *in vivo*: ratones BALB/c se alimentaron con los extractos (a), (b) y (c) en una cantidad de 500 mg/kg, respectivamente. Después de 2 horas, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 1 mg/kg de LPS en PBS. La sangre se recogió después de 1,5 horas. La concentración de TNF- α y IL-6 en el suero de ratones se cuantificó por ELISA (R&D System®). Las tasas de inhibición (%) de TNF- α y IL-6 en el suero se calcularon basándose en la concentración de TNF- α y IL-6 en el suero antes de que los ratones se alimentaran con los extractos. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

25

[Tabla 6]

Extracción con disolvente	Extractos	Inhibición de TNF- α (%)	Inhibición de IL-6 (%)
50 % de etanol	(a)	92,8	81,7
50 % de etanol + hexano	(b)	99,3	78,4
50 % de etanol + acetato de etilo	(c)	98,6	83,0

[Ejemplo 6] Aislamiento de cariofilina por diferentes extracciones con disolvente

5 g de *Bupleurum krylovianum* molido seleccionado en el Ejemplo 1 se dividieron igualmente y se añadieron a cinco matraces redondos de 1 l. A cada matraz se añadieron 10 ml de metanol, etanol, isopropanol, butanol y decanol, respectivamente. Cada matraz se vibró por ultrasonidos durante 10 minutos y los extractos se recogieron individualmente. El volumen para cada extracto se ajustó a 10 ml. Mientras tanto, se establecieron patrones del siguiente modo: 0,3 mg/ml, 0,27 mg/ml, 0,21 mg/ml, 0,15, 0,09 mg/ml, 0,06 mg/ml y 0,03 mg/ml de cariofilina. Las cantidades de cariofilina en los extractos se determinaron como se muestra en la Tabla 7.

30

35

[Tabla 7]

Disolvente para la extracción	Cantidad de cariofilina en los extractos (%)
Metanol	0,32
Etanol	0,30
Isopropanol	0,21
Butanol	0,08
Decanol	0,10

[Ejemplo 7] Efectos de inhibición por diferentes tiempos de extracción

2,0 kg de *Bupleurum krylovianum* seleccionado molido en el Ejemplo 1 y 16,3 l de disolución al 50 % de etanol se añadieron a un matraz redondo de 20 l con calentamiento con reflujo. Las disoluciones se recogieron por separado después de 2, 3, 4 y 5 horas y luego se secaron y se concentraron obteniéndose extractos. Mientras tanto, se establecieron patrones del siguiente modo: 0,3 mg/ml, 0,27 mg/ml, 0,21 mg/ml, 0,15, 0,09 mg/ml, 0,06 mg/ml y 0,03 mg/ml de cariofilina. Las cantidades de cariofilina en los extractos se determinaron como se muestra en la Tabla 8.

Además, ratones BALB/c se alimentaron con los extractos en una cantidad de 500 mg/kg, respectivamente. Después de 2 horas, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 1 mg/kg de LPS en PBS. La sangre se recogió después de 1,5 horas. La concentración de TNF- α y IL-6 en el suero de ratones se cuantificó por ELISA (R&D System®). Las tasas de inhibición (%) de TNF- α y IL-6 en el suero se calcularon basándose en la concentración de TNF- α y IL-6 en el suero antes de que los ratones se alimentaran con los extractos. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

[Tabla 8]

Tiempo de extracción	Cantidad de cariofilina en el extracto	Inhibición de TNF- α (%)	Inhibición de IL-6 (%)
2 h	1,10	84,4	-34,7
3 h	1,08	70,5	-6,8
4 h	1,06	100,0	46,0
5 h	1,06	99,7	-0,9

[Ejemplo 8] Efecto del extracto de etanol sobre la respuesta inflamatoria inducida por LPS en un modelo de ratón

Ratones BALB/c se alimentaron con el extracto (a) en el Ejemplo 5 (i) en una cantidad de 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg y 2000 mg/kg, respectivamente. Después de 2 horas, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 1 mg/kg de LPS en PBS. La sangre se recogió después de 1,5 horas. La concentración de TNF- α y IL-6 en el suero de ratones se cuantificó por ELISA (R&D System®). Las tasas de inhibición (%) de TNF- α y IL-6 en el suero se calcularon basándose en la concentración de TNF- α y IL-6 en el suero antes de que los ratones se alimentaran con los extractos. Los resultados se muestran en la Fig. 5 y 6. El control se alimentó con 10 ml/kg de 2 % de Tween 80 como vehículo.

[Ejemplo 9] Efecto del extracto de etanol sobre la respuesta inflamatoria inducida por LPS en un modelo de ratón en diferentes tiempos de administración

Ratones BALB/c se alimentaron con el extracto (a) en el Ejemplo 5 (i) en una cantidad de 500 mg/kg. Los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 1 mg/kg de LPS en PBS, respectivamente, a 1, 2, 4 y 6 horas después de alimentarse con el extracto. La sangre se recogió después de 1,5 horas. La concentración de TNF- α y IL-6 en el suero de ratones se cuantificó por ELISA (R&D System®). Las tasas de inhibición (%) de TNF- α y IL-6 en el suero se calcularon basándose en la concentración de TNF- α y IL-6 en el suero antes de que los ratones se alimentaran con el extracto. Los resultados se muestran en la Fig. 5 y 6. El control se alimentó con 10 ml/kg de 2 % de Tween 80 como vehículo.

[Ejemplo 10] Efecto del extracto de etanol sobre el edema de la pata trasera inducida por carragenina en un modelo de rata

Ratas Long-Evan se alimentaron con el extracto (a) en el Ejemplo 5 (i) en una cantidad de 250 mg/kg, 500 mg/kg,

1000 mg/kg, respectivamente. El control positivo se alimentó con 3 mg/kg de indometacina (AINE). El control negativo se alimentó con 10 ml/kg de 2 % de Tween 80 como vehículo. Después de 1 hora, las ratas se inyectaron con 0,1 ml de 1 % de carragenina en la pata trasera izquierda. El volumen de la pata trasera izquierda de la rata se midió por pletismómetro (Stoelting) en 0, 1,5 y 3 horas después de la inyección. La inhibición se calculó por la fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = (\text{Nt}-\text{Nv})/\text{Nv} \times 100$$

En la fórmula, Nt representa el volumen de la pata trasera izquierda de la rata alimentada con el extracto de etanol; Nv representa la pata trasera izquierda de la rata alimentada con el vehículo.

La inhibición fue negativa cuando el extracto de etanol mostró efectos antiinflamatorios.

[Tabla 9]

Administración	Inhibición en 0 horas (%)	Inhibición en 1,5 horas (%)	Inhibición en 3 horas (%)
Vehículo	0	0	0
250 mg/kg de extracto de etanol	0	3	14
500 mg/kg de extracto de etanol	0	55	52
1000 mg/kg de extracto de etanol	0	29	62
3 mg/kg de indometacina	0	21	52

[Ejemplo 11] Efecto del extracto de etanol sobre la artritis inducida por adyuvante en un modelo de rata

Las ratas se clasificaron en 5 grupos. Cada grupo tuvo 5 ratas. Las ratas se inyectaron con 50 µl de *Mycobacterium butyricum* en escualeno en 3 puntos sobre la raíz de la cola (inyección total: 50 µl/rata). Las ratas en 5 grupos se alimentaron inmediatamente con 500 mg/kg del extracto (a) en el Ejemplo 5 (i), 1000 mg/kg del extracto (a) en el Ejemplo 5 (i), 3 mg/kg de indometacina, 0,1 mg/kg de dexametasona y 10 ml/kg de 2 % de Tween 80 (vehículo), respectivamente. Los síntomas de la artritis en cada grupo se estimaron según las puntuaciones:

- 0: Las patas no estaban rojas e hinchazón;
- 1: Las patas estaban ligeramente rojas e hinchazón o una articulación del dedo de la pata estaba roja e hinchazón;
- 2: Las patas estaban aparentemente rojas e hinchazón o más de dos articulaciones del dedo de la pata estaban rojas e hinchazón;
- 3: La pata trasera era incapaz de funcionar para andar;
- 4: La articulación del tobillo era incapaz de moverse.

El resultado se muestra en la Fig. 10. El extracto de etanol mostró la inhibición de artritis, en comparación con el grupo de vehículo (p<0,05). La administración de indometacina y doxametasona fue el control positivo.

[Ejemplo 12] Efecto del extracto de etanol sobre la artritis inducida por colágeno en un modelo de rata

Se emulsionaron 2 mg/ml de un colágeno tipo II bovino de feto con una cantidad igual de un adyuvante completo de Freund (CFA) o adyuvante incompleto de Freund (IFA) mediante homogeneización (IKA, RW20 DZM.n.). Las ratas se clasificaron en 4 grupos. Cada grupo tuvo 8 ratas. A cada rata se inyectó intracutáneamente 50 µg del colágeno y emulsión de CFA. En el octavo día, cada rata se inyectó con 100 µg del colágeno y emulsión de IFA para inducir artritis. Las ratas en 4 grupos se alimentaron inmediatamente con 50 mg/kg del extracto (a) en el Ejemplo 5 (i), 30 mg/kg de celebrex (AINE), 10 ml/kg de 1 % de carboximetilcelulosa (CMC) (vehículo) y nada, respectivamente. Los síntomas de la artritis en cada grupo se estimaron según las puntuaciones:

- 0: La pata no estaba roja e hinchazón;
- 1: La pata estaba ligeramente roja e hinchazón o una articulación del dedo de la pata estaba roja e hinchazón;
- 2: La pata estaba aparentemente roja e hinchazón o más de dos articulaciones del dedo de la pata estaban rojas e hinchazón;
- 3: La pata trasera era incapaz de funcionar para andar;
- 4: La articulación del tobillo era incapaz de moverse.

El resultado mostró que 50 mg/kg del extracto de etanol pueden producir una evidente inhibición de artritis (Fig. 11). La administración de celebrex fue el control positivo y CMC fue el control negativo. El grupo que no se alimentó fue una prueba de blanco.

[Ejemplo 13] Efecto de cariofilina y el isómero cis sobre TNF- α (para referencia)

5 La línea celular, U937 (línea celular de monocitos humana) se incubó en medio RPMI que contenía 50 ng/ml de PMA (12-miristato-13-acetato de forbol) (Sigma) y 10% de suero bovino fetal (Moor y col., Roswell Park Memorial Institute) durante 24 horas. La línea celular se movió entonces al medio RPMI sin PMA durante adicionalmente 48 horas. La U937 activada se sembró en una placa de 96 pocillos en una concentración de $1,6 \times 10^5$ célula/pocillo. A los pocillos se añadieron 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ de cariofilina y 1 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ y 30 $\mu\text{g/ml}$ de isocariofilina y 10 μl de tampón, respectivamente. Cada pocillo se ajustó a un volumen final de 190 μl . La placa se hizo reaccionar bajo 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. A cada pocillo se añadieron 10 μl de 20 $\mu\text{g/ml}$ de LPS para estimular las células. Después de 4 horas bajo 37 $^{\circ}\text{C}$, la placa se centrifugó para recoger los sobrenadantes.

La cantidad de TNF- α en el sobrenadante se midió por ELISA (R&D System®) basándose en el control (DMSO). Mientras tanto, la viabilidad celular se midió por ensayo de MTT (Sigma).

15 Los resultados mostraron que la cariofilina y el isómero cis tenían efectos para inhibir la secreción de TNF- α . El valor de CI_{50} de cariofilina fue $44 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 12). El valor de CI_{50} de isocariofilina fue $18 \pm 4 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 13).

[Ejemplo 14] Efecto de cariofilina y el isómero cis sobre IL-6 (para referencia)

20 La línea celular, U937, se cultivó como el Ejemplo 13. Entonces, U937 activada se sembró en una placa de 96 pocillos en una concentración de $1,6 \times 10^5$ células/pocillo. A los pocillos se añadieron 6,3 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$ de cariofilina y 3,8 $\mu\text{g/ml}$, 7,5 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$ y 30 $\mu\text{g/ml}$ de isocariofilina y 10 μl de tampón, respectivamente. Cada pocillo se ajustó a un volumen final de 190 μl . La placa se puso bajo 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. A cada pocillo se añadieron 10 μl de 20 $\mu\text{g/ml}$ de LPS para estimular las células. Después de 16-18 horas bajo 37 $^{\circ}\text{C}$, la placa se centrifugó para recoger los sobrenadantes.

25 La cantidad de IL-6 en el sobrenadante se midió por ELISA (R&D System®) basándose en el control (DMSO). Mientras tanto, la viabilidad celular se midió por ensayo de MTT (Sigma).

Los resultados mostraron que la cariofilina y el isómero tenían efectos para inhibir la secreción de IL-6. El valor de CI_{50} de cariofilina fue $13 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 14). El valor de CI_{50} de isocariofilina fue $24 \pm 6 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 15).

[Ejemplo 15] Efecto del extracto de etanol en un modelo de ratón con enteritis

30 Los ratones BABL/c se clasificaron en 4 grupos. Cada grupo tuvo 6 ratas. Un grupo se inyectó con 50 % de etanol y los otros se inyectaron con 1,75 mg de sulfonato de trinitrobenceno (TNBS) (Sigma) en el colon (4 cm desde el ano). Los grupos tratados con TNBS se alimentaron inmediatamente con 100 mg/kg del extracto (a) en el Ejemplo 5 (i), 0,6 mg/kg de dexametasona (DEX) y nada, respectivamente. Después de 48 horas, el colon (6 cm desde el ano) de cada ratón se escindió y el colon se sumergió en PBS durante 2 horas. La infusión de colon se midió para las cantidades de TNF- α , IL-6 y G-CSF. La inhibición de TNF- α , IL-6 y G-CSF se calculó basándose en el grupo tratado con TNBS sin alimentar nada. Los resultados se muestran en la Tabla 10, en los que un valor negativo representa secreción potenciada de TNF- α , IL-6 y G-CSF.

[Tabla 10]

Grupo	Inhibición de TNF- α (%)	Inhibición de IL-6 (%)	Inhibición de G-CSF (%)
50 % de etanol	74	96	93
1,75 mg de TNBS	0	0	0
100 mg/kg del extracto de etanol + 1,75 mg de TNBS	50	43	60
0,6 mg/kg de DEX + 1,75 mg de TNBS	9	-55	-38

[Ejemplo 16] Efecto de especies de *Bupleurum* sobre la respuesta inflamatoria inducida por LPS en un modelo de ratón

40 Seis especies de *Bupleurum* seleccionadas del Ejemplo 1 se pulverizaron individualmente y cribaron por un tamiz de

5 de malla.

5 50 g de cada *Bupleurum* molido y 400 ml de disolución acuosa al 50 % de etanol se añadieron a seis matraces redondos de 2 l. Los matraces se calentaron a reflujo durante 2 horas. La disolución se recogió. Después de secar y concentrar se obtuvieron los extractos (1)-(6), que se corresponden con las líneas (b)-(g) de las especies de *Bupleurum* en el Ejemplo 1.

10 Ratones BALB/c se alimentaron con 1000 mg/kg del extracto (1) y 500 mg/kg de los extractos (2)-(6), respectivamente. Después de 2 horas, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 1 mg/kg de LPS en PBS. La sangre se recogió después de 1,5 horas. La concentración de TNF- α y IL-6 en el suero de ratones se cuantificó por ELISA (R&D System®). Las tasas de inhibición (%) de TNF- α y IL-6 en el suero se calcularon basándose en la concentración de TNF- α y IL-6 en el suero de los ratones sin alimentar con los extractos. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

[Tabla 11]

Extractos	Inhibición de TNF- α (%)	Inhibición de IL-6 (%)
Extractos (1)	44	-6
Extractos (2)	99	50
Extractos (3)	75	42
Extractos (4)	25	29
Extractos (5)	27	51
Extractos (6)	34	11

[Ejemplo 17] Identificación de *Bupleurum* por secuenciación de ITS

15 0,5~1 g de los seis *Bupleurum* (b)-(g) en el Ejemplo 1 se pulverizaron individualmente con líquido nitrógeno. El polvo se vertió en tubos de centrifuga que contenían 7~10 ml de un tampón CTAB y se mezclaron bien. El tubo se vibró 30~60 minutos bajo 70 °C. A los tubos se añadieron 5 ml de cloroformo y se mezclaron bien. Los tubos se centrifugaron a 8.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se eliminaron. Los precipitados se centrifugaron a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se eliminaron de nuevo. A cada tubo se añadieron 3 ml de NaCl 1,2 M que contenía RNasa. Los tubos se vibraron durante 30~60 min a 37 °C, se añadieron 20 3 ml de cloroformo y se mezclaron bien. Los tubos se centrifugaron a 8.000 rpm durante 5 min a 4 °C. Los sobrenadantes se movieron a nuevos microtubos de centrifuga de 1,5 ml y se añadió isopropanol de 0,6 veces el del volumen. Los tubos se pusieron en un refrigerador a -20 °C para precipitar durante la noche. Después de centrifugarse, los precipitados se lavaron por 75 % de etanol una vez y se secaron. Los precipitados se resolvieron con 50 μ l de TE. La disolución fue bajo PCR con cebadores para amplificar las secuencias de ADN de las especies de *Bupleurum*. Las secuencias de ADN de *Bupleurum* (b)-(g) se muestran en la lista de secuencias según SEC ID N° 1~6.

<110> Industrial Technology Research Institute

<120> COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA CON FUNCIÓN INMUNOMODULADORA

<130> TT 0090 EP

30 <160> 6

<210> 1
 <211> 629
 <212>ADN
 <213> *Bupleurum*

35 <400> 1

ggatcattgt	cgaatcctga	aacgaagagc	gacccgagaa	catgttttaa	gacggggcca	60
gCGGtSgtcg	gcctcggcct	gacggctgcg	aaccctaggc	cggggggctc	ctagtgtgtc	120
ccgCCgGccc	aaaacctaac	cgggcgcgga	atgCGccaag	gaaaccgaaa	ctgaacagga	180
tgtctccgcc	ccgtttgagg	gggggtcgac	atccttctga	gaaacaaacg	actctcggca	240
acggatatcc	cggctctcgc	atcgatgaag	aacgtagcga	aatgCGatac	ttggtgtgaa	300
ttgcagaatc	ccgtgaacca	tcgagttttt	gaacgcaagt	tgcgcccgat	gccattaggc	360
tgagggcacg	tctgcctggg	tgtcacgtaa	agctttgccc	ctccgcagct	cgctcaaagc	420
gagtcggtgc	tgttcggggg	gacggaaatt	gacctcccgt	gcctcgtcgt	gCGGctggtt	480
taaaagagag	tctccggaga	tcggaaaacg	caacattggt	ggaatgcatt	acgcacctct	540
tgccatcttg	cgctgagccc	gtttactctg	tgagcaacag	cgaccctttg	gcgCCgcccc	600
aggtgCGcgc	tcgaactgtg	accccaggt				629

<210> 2
 <211> 629
 <212>ADN

5 <213> *Bupleurum*

<400> 2

ggatcattgt	cgaatcctga	atcgaagtgc	gacccgagaa	catgttttaa	gacggggcca	60
gCGGtCgtcg	gcctcggcct	gacggctgcg	aaccctaggt	cggggggcgc	ctagtgtgtc	120
ctgCCgGccc	aaaacctaac	cgggcgcgga	atgCGccaag	gaaaccgaaa	ctgaacagga	180
tgtctccgcc	ccgtttgagg	gggggtcatc	atccttctga	gaaacaaacg	actctcggca	240
acggatatcc	cggctctcgc	atcgatgaag	aacgtagcga	aatgCGatac	ttggtgtgaa	300
ttgcagaatc	ccgtgaacca	tcgagttttt	gaacgcaagt	tgcgcccgat	gccattaggc	360
tgagggcacg	tctgcctggg	tgtcacgtaa	agctttgccc	ctccgcagct	cgctcaaagc	420
gagtcgttga	tgttcggggg	gacggaaagt	gacctcccgt	gcctcgtcgt	gCGGctggtt	480
taaaagagag	tctccggaga	tcggaaaacg	caacattggt	ggaaggcatt	acgcacctct	540
tgccatcttg	cgctgagccc	gtttactcca	tgagcaacag	cgaccctttg	gcgCCgcccc	600
aggtgagcgc	tcgaactgtg	accccaggt				629

<210> 3
 <211> 629
 <212>ADN
 <213> *Bupleurum*

10

<220>
 <221>
 <222> 107

15 <223> nucleótido no especificado, n es cualquiera de g, a, t o c

<400> 3

ggatcattgt	cgaatcctga	atcgaagagc	gacccgagaa	catgttttaa	gacggggcca	60
gCGGtCgtcg	gcctcggcct	gacggctgcg	aaccctaggc	cgggggntgc	ctagtgtgtc	120
ccgCCgGccc	aaaacctaac	cgggcgcgga	atgCGccaag	gaaaccgaaa	ctgaacagga	180
tgtctccgcc	ccgtttaagg	gggggtcgac	atccttctga	gaaacaaacg	actctcggca	240
acggatatcc	cggctctcgc	atcgatgaag	aacgtagcga	aatgCGatac	ttggtgtgaa	300
ttgcagaatc	ccgtgaacca	tcgagttttt	gaacgcaagt	tgcgcccgat	gycattaggc	360
tgagggcacg	tctgcctggg	tgtcacgtaa	agctttgccc	ctccgcagct	cgctcaaadc	420
gagtcggtgc	tgttcggggg	gacggaaatt	gacctcccgt	gcctcgtcgt	gCGGctggtt	480
taaaagagag	cctccggaga	tcggaaaacg	caacattggt	ggaaggcatt	acgcacctct	540
tgccatcttg	cgctgagccc	gttyactctg	tgagcaacag	cgaccctttg	gcgCCgcccc	600
aggcgCGcgc	tcgaactgtg	accccaggt				629

<210> 4
 <211> 629
 <212>ADN
 <213> *Bupleurum*

20

<400> 4

ES 2 450 417 T3

```

ggatcattgt cgaatcctga atcgaagacc gacccgagaa catgttttaa gacggggcca 60
gcggtcgtcg gcctcggcct gacggctgcg aaccctaggc cggggggcgc ctagtgtgtc 120
ccgccggccc aaaacctaac cgggcgcgga atgcccgaag gaaaccgaaa ctgaacagga 180
tgtctccgcc ccgtttgagg gggggtcgac atccttcaaa gaaacaaacg actctcggca 240
acggatatcc cggctctcgc atcgatgaag aacgtagcga aatgcgatac ttggtgtgaa 300
ttgcagaate ccgtgaacca tcgagttttt gaacgcaagt tgcgcccgat gccattaggc 360
tgagggcacg tctgcctggg tgtcacgtat agctttgccc ctccgcagct cgctcaaagc 420
gagtcgttgc tgttcggggg gacggaaatt gacctcccgt gcctcgtcgt gcggctggtt 480
taaaagagag tctccggaga tcggaaaacg caacattggt ggaatgcatt acgcacctct 540
tgccatcttg cgctgagccc gtttactctg tgagcaacag cgaccctttg gcgccgcccc 600
aggtgcgcgc tcgaactgtg accccaggt

```

<210> 5

<211> 629

<212>ADN

5 <213> *Bupleurum*

<400> 5

```

ggatcattgt cgaatcctga atcgaagagc gacccgagaa catgttttaa gacggggcca 60
gcggtcgtcg gcctcggcct gacgtctgcg aaccctaggc cggggggcgc ctagtgtgtc 120
ccgccggccc aaaacctaac cgggcgcgga atgcccgaag gaaaccgaaa ctgaacagga 180
tgtctccgcc ccgtttgagg gggggtcgac atccttctga gaaacaaacg actctcggca 240
acggatatcc cggctctcgc atcgatgaag aacgtagcga aatgcgatac ttggtgtgaa 300
ttgcagaatc ccgtgaacca tcgagttttt gaacgcaagt tgcgcccgat gccattaggc 360
tgagggcacg tctgcctggg tgtcacgtaa agctttgccc ctccgcagct cgctcgaagc 420
gagtcgttgc tgttcggggg gacggaaagt gacctcccgt gcctcgtcgt gcggctggtt 480
taaaagagag cctccggaga tcggaaaacg caacattggt ggaaggcatt acgcacctct 540
tgccatcttg cgctgagccc gtttactctg tgagcaactg cgaccctttg gcgccgcccc 600
aggtgcgcgc tcgaactgtg accccaggt

```

<210> 6

10 <211> 629

<212>ADN

<213> *Bupleurum*

<400> 6

```

ggatcattgt cgaatcctga atcgaagagc gacccgagaa catgttttaa gacggggcca 60
gcggtcgtcg gcctcggcct gacggctgcg aaccctaggc cggggggcgc ctagtgtgtc 120
ccgccgacc aaacctaac cgggcgcgga atgcccgaag gaaaccgaaa ctgaacagga 180
tgtctccgcc cctttcgagg gggggtcgac atccttctga aaaacaaacg actctcggca 240
acggatatcc cggctctcgc atcgatgaag aacgtagcga aatgcgatac ttggtgtgaa 300
ttgcagaatc ccgtgaacca tcgagttttt gaacgcaagt tgcgcccgat gccattaggc 360
cgagggcacg tctgcctggg tgtcacgtaa agctttgccc ctccgcagct cgctcaaagc 420
gagtcgttgc tctcgtggg gacggaaatt gacctcccgt gcctcgtcgt gcggctggtt 480
taaaagagag tctccgggga tcggaaaacg caacattggt ggaaggcatt acgcacctct 540
tgccatcttg cgctgagccc gtttactctg tgagcaacag cgaccctttg gcgccgcccc 600
aggtgcgcgc tcgaactgtg accccaggt

```

15

REIVINDICACIONES

1. Uso de un extracto de *B. krylovianum* en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de artritis o artritis reumatoide, en el que el extracto de *B. krylovianum* se obtiene moliendo *Bupleurum krylovianum*, añadir *Bupleurum krylovianum* molido a una disolución acuosa de etanol y aislando el extracto del disolvente.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en el que el volumen del disolvente es 5~10 veces el de *B. krylovianum*.
3. El uso según la reivindicación 1, en el que el tiempo para la extracción es 2 a 24 horas.
4. El uso según la reivindicación 1, en el que el extracto se calienta adicionalmente a reflujo.
5. El uso según la reivindicación 1, en el que la extracción es bajo temperatura ambiente a una temperatura de ebullición de la disolución acuosa de etanol.
- 10 6. El uso según la reivindicación 1, en el que el extracto comprende cariofilina o isómero cis como principio activo.

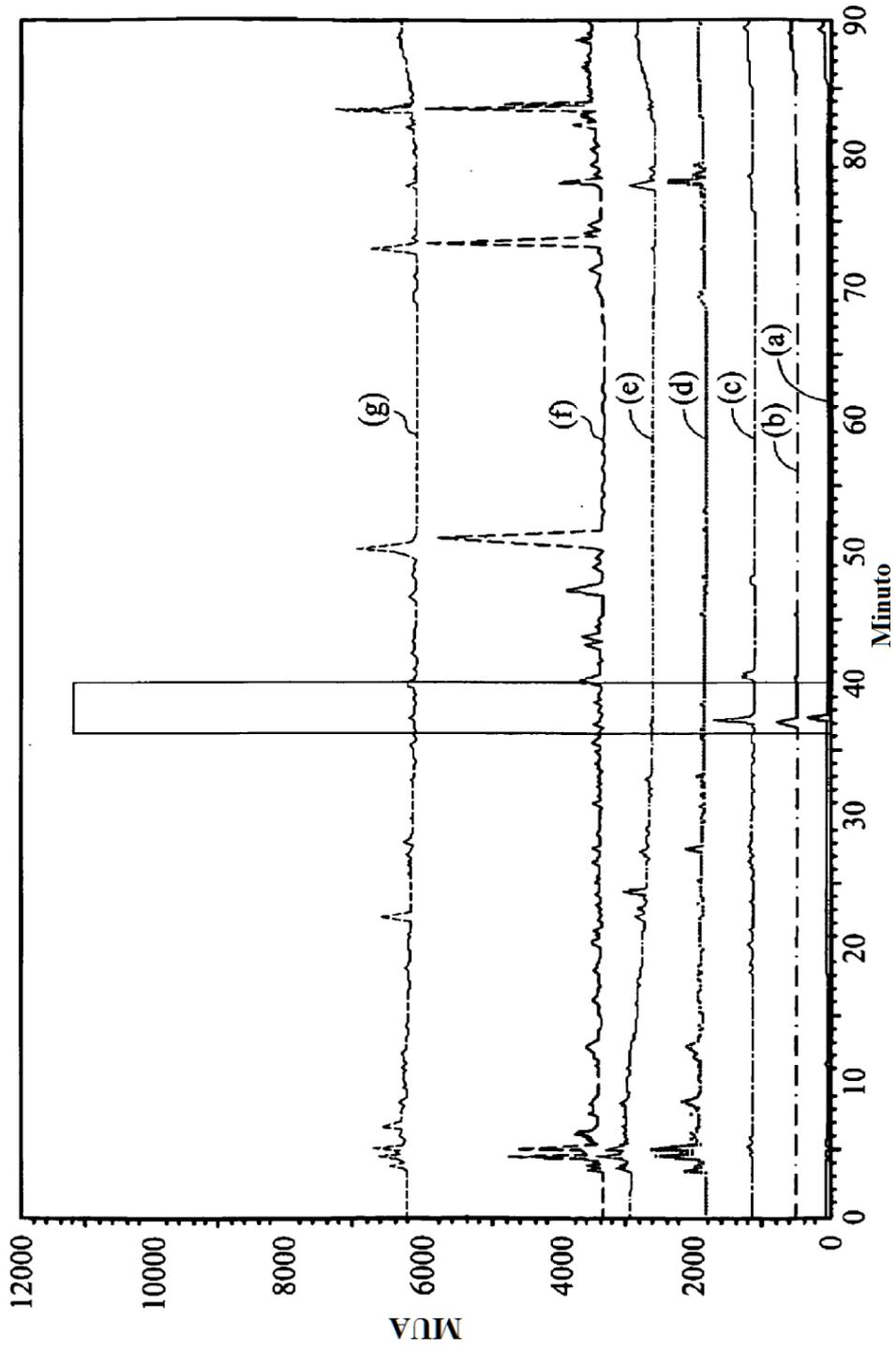


FIG. 1

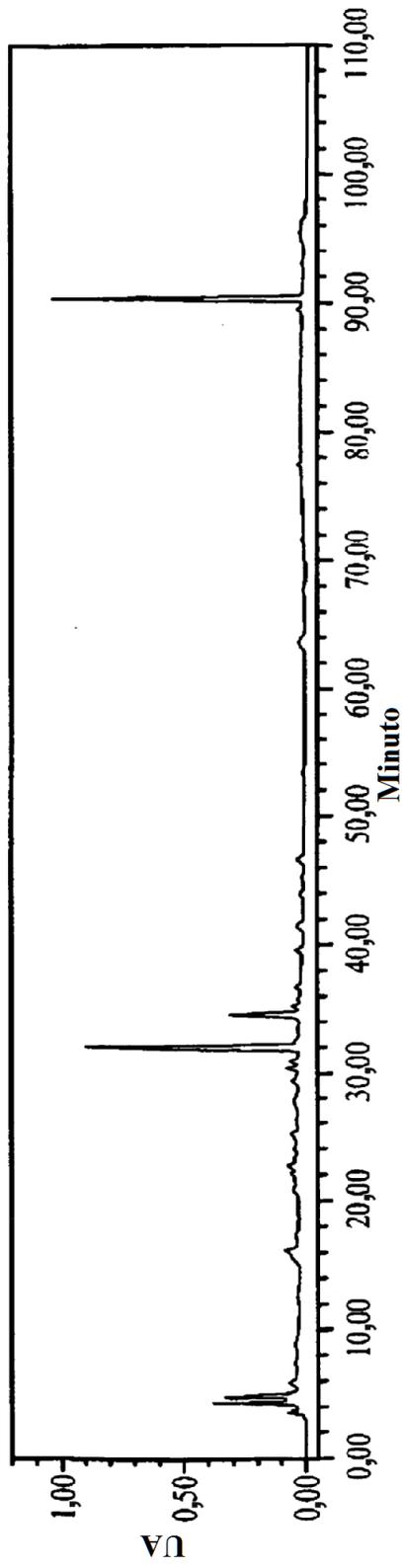


FIG. 2

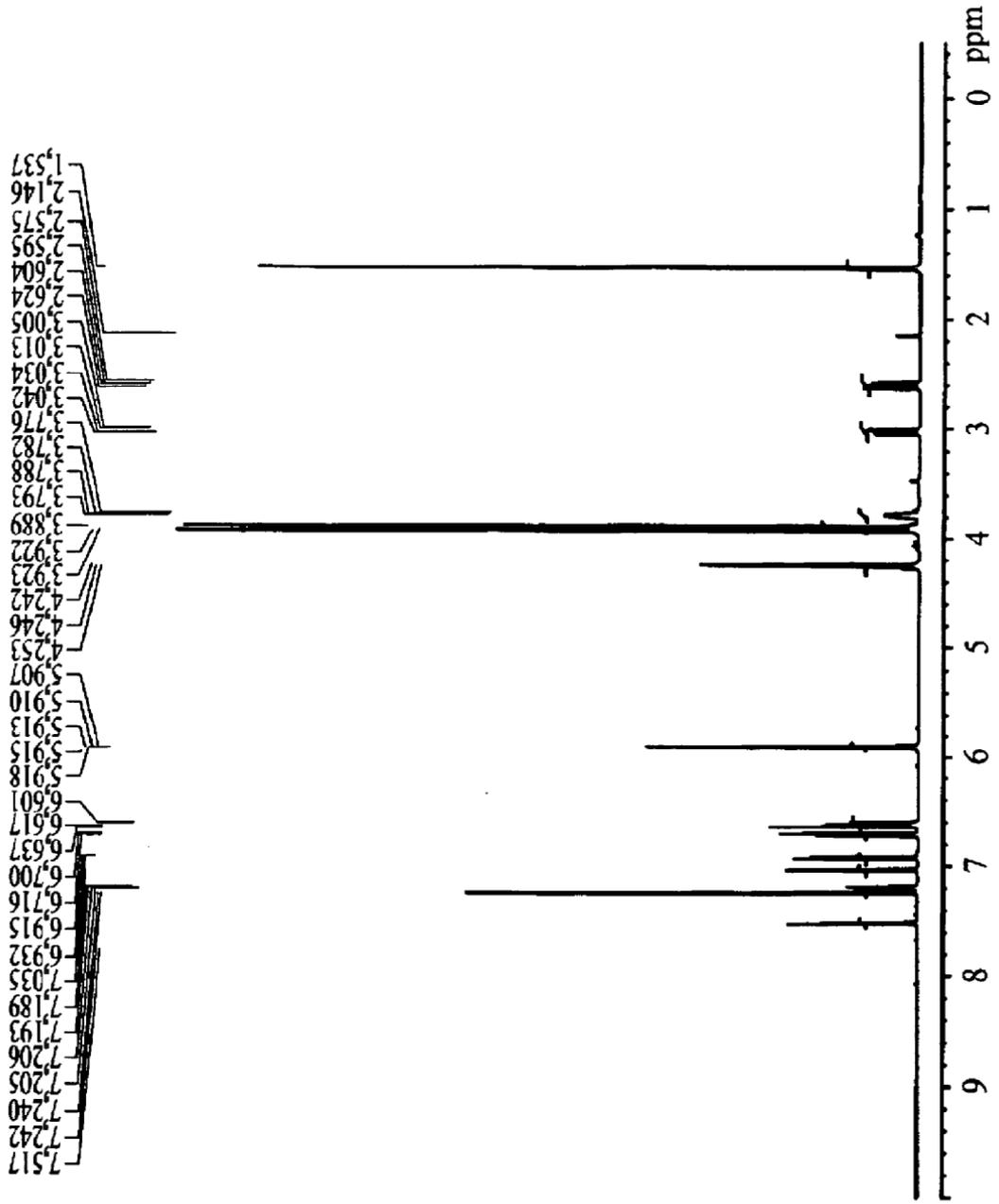


FIG. 3a

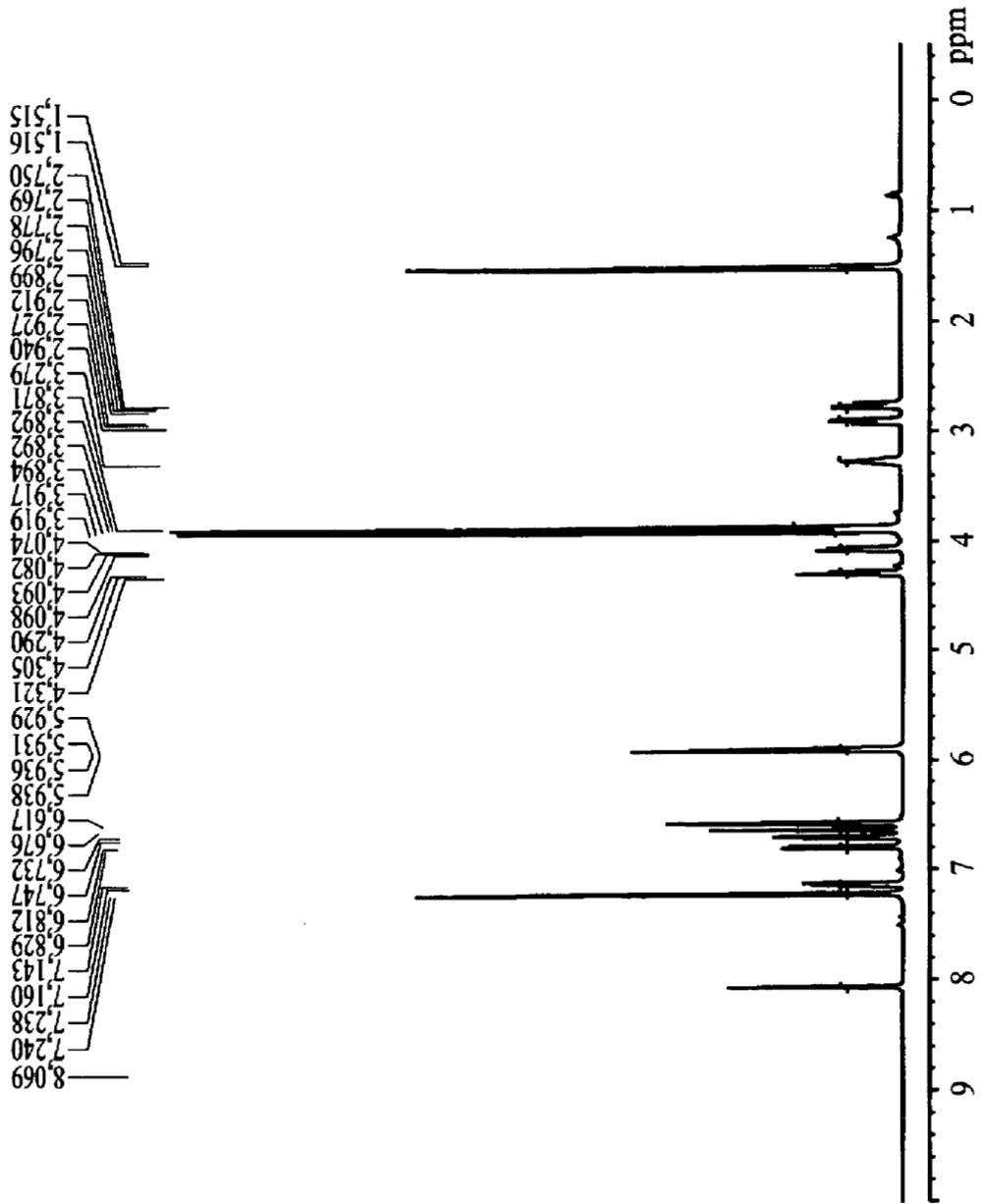


FIG. 3b

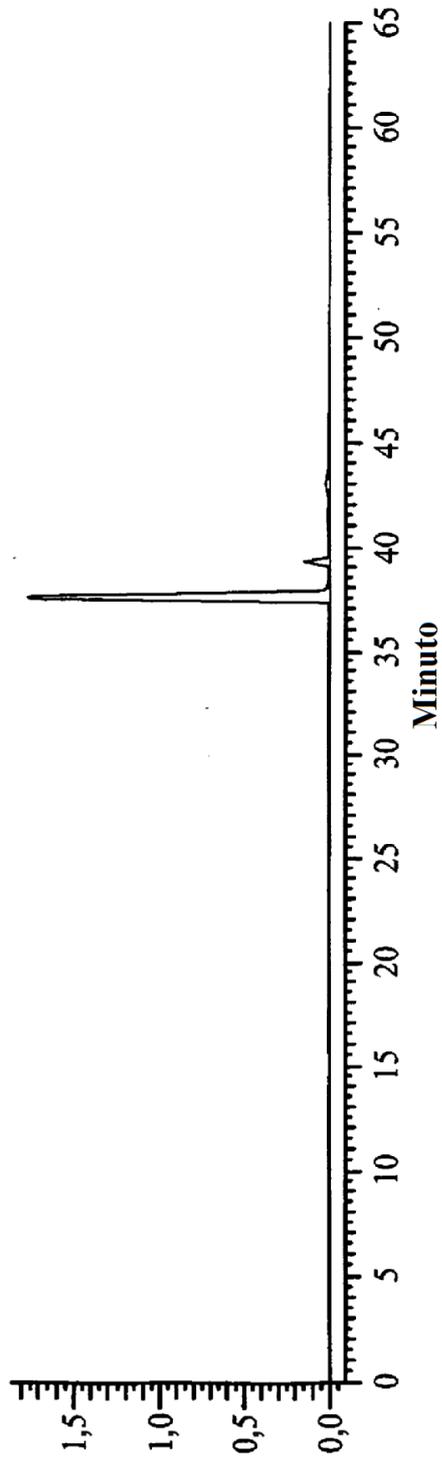


FIG. 4a

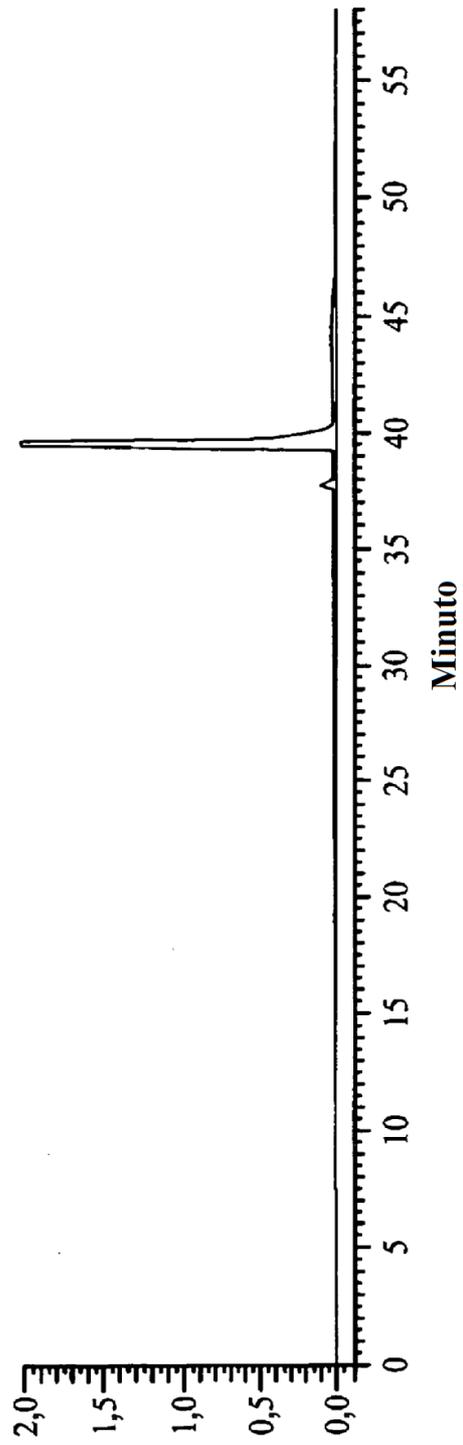
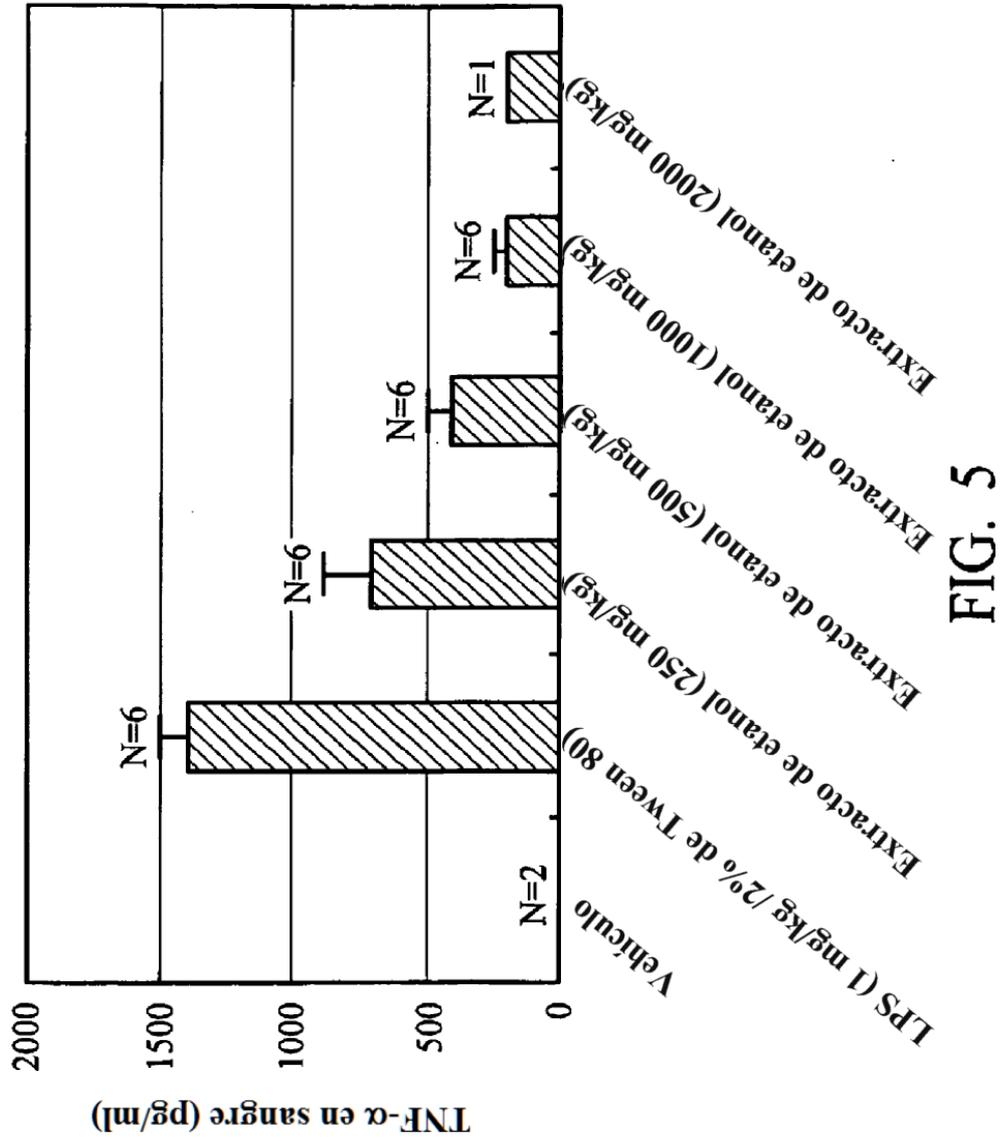


FIG. 4b



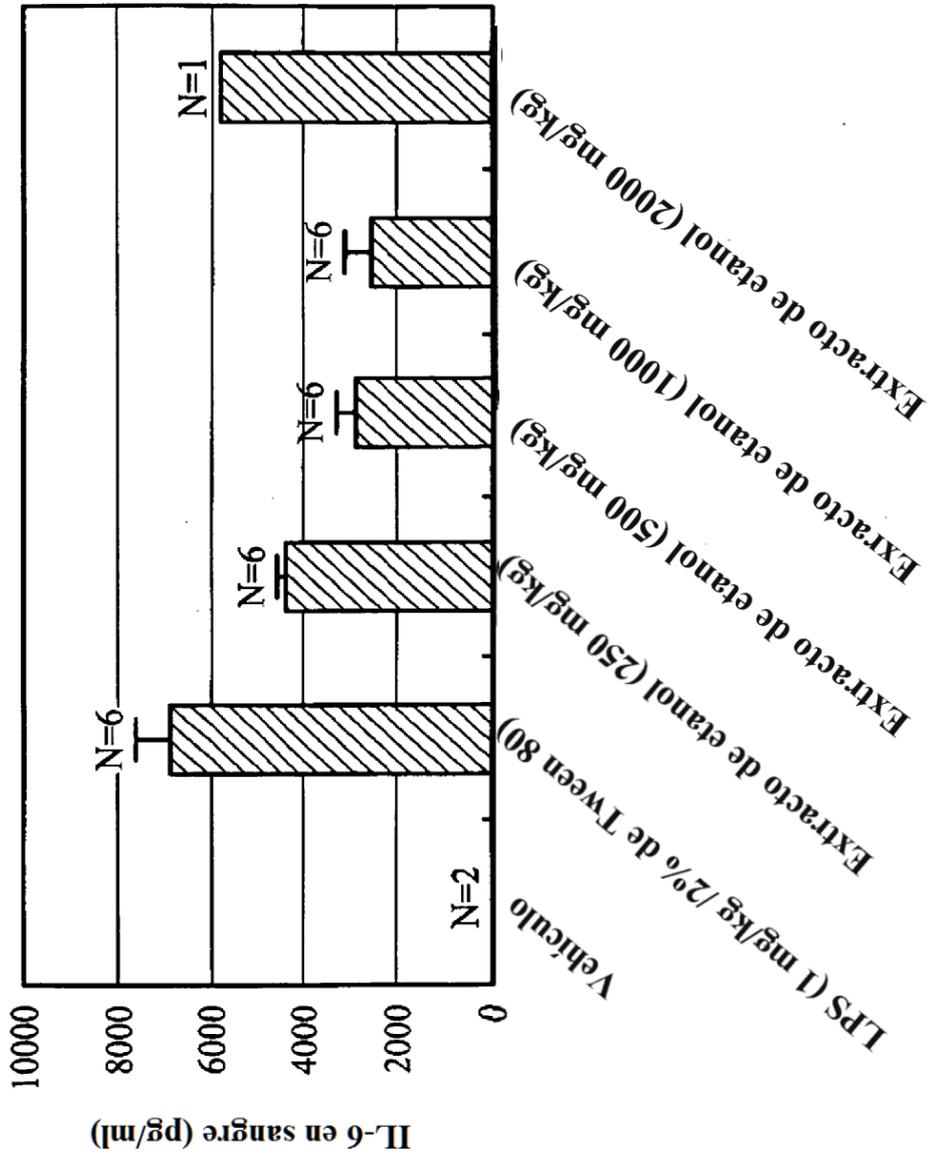
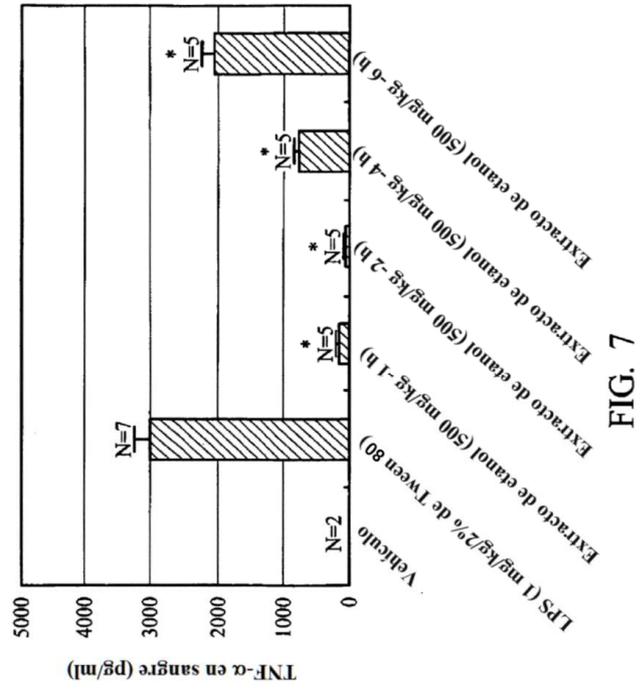


FIG. 6



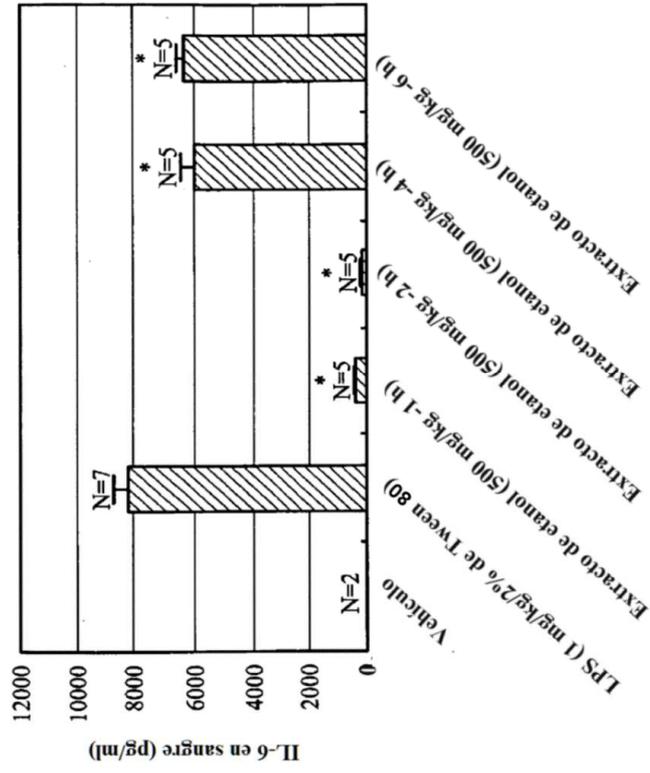


FIG. 8

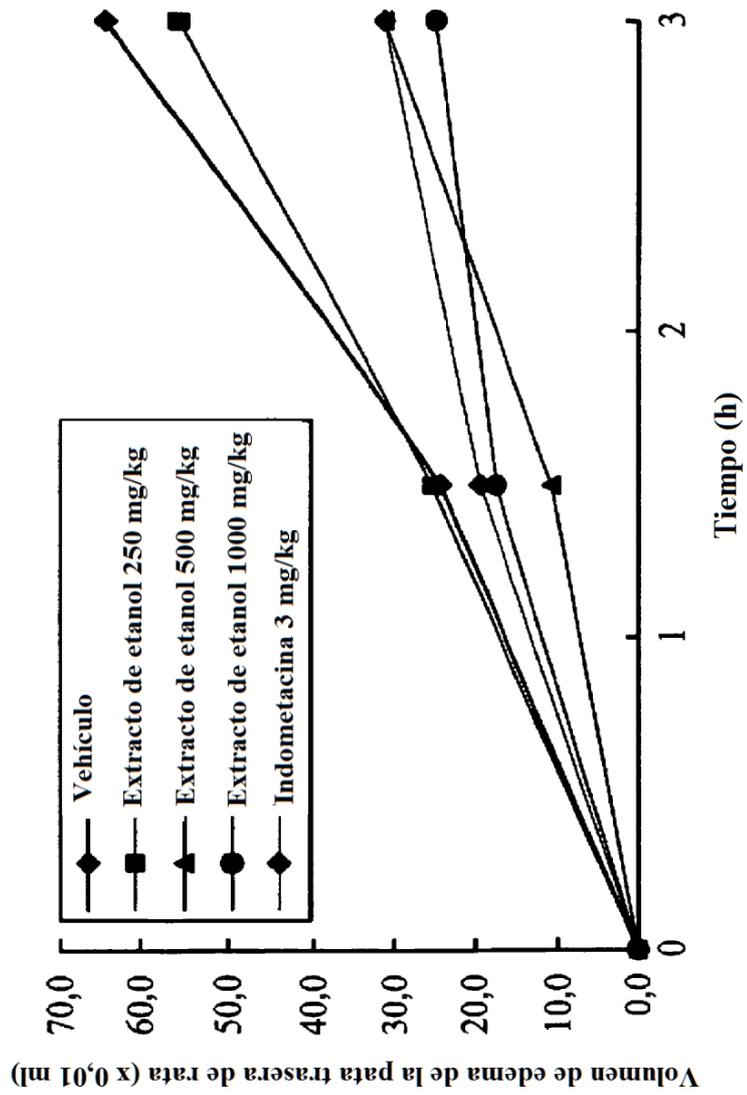


FIG. 9

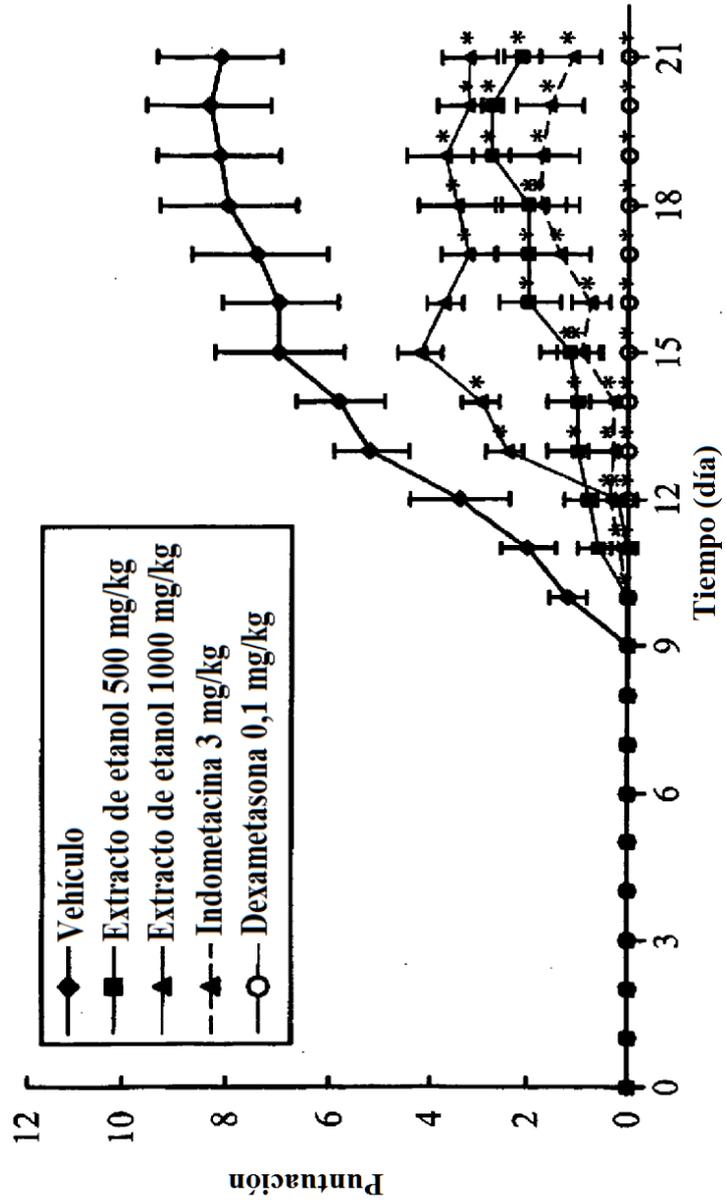


FIG. 10

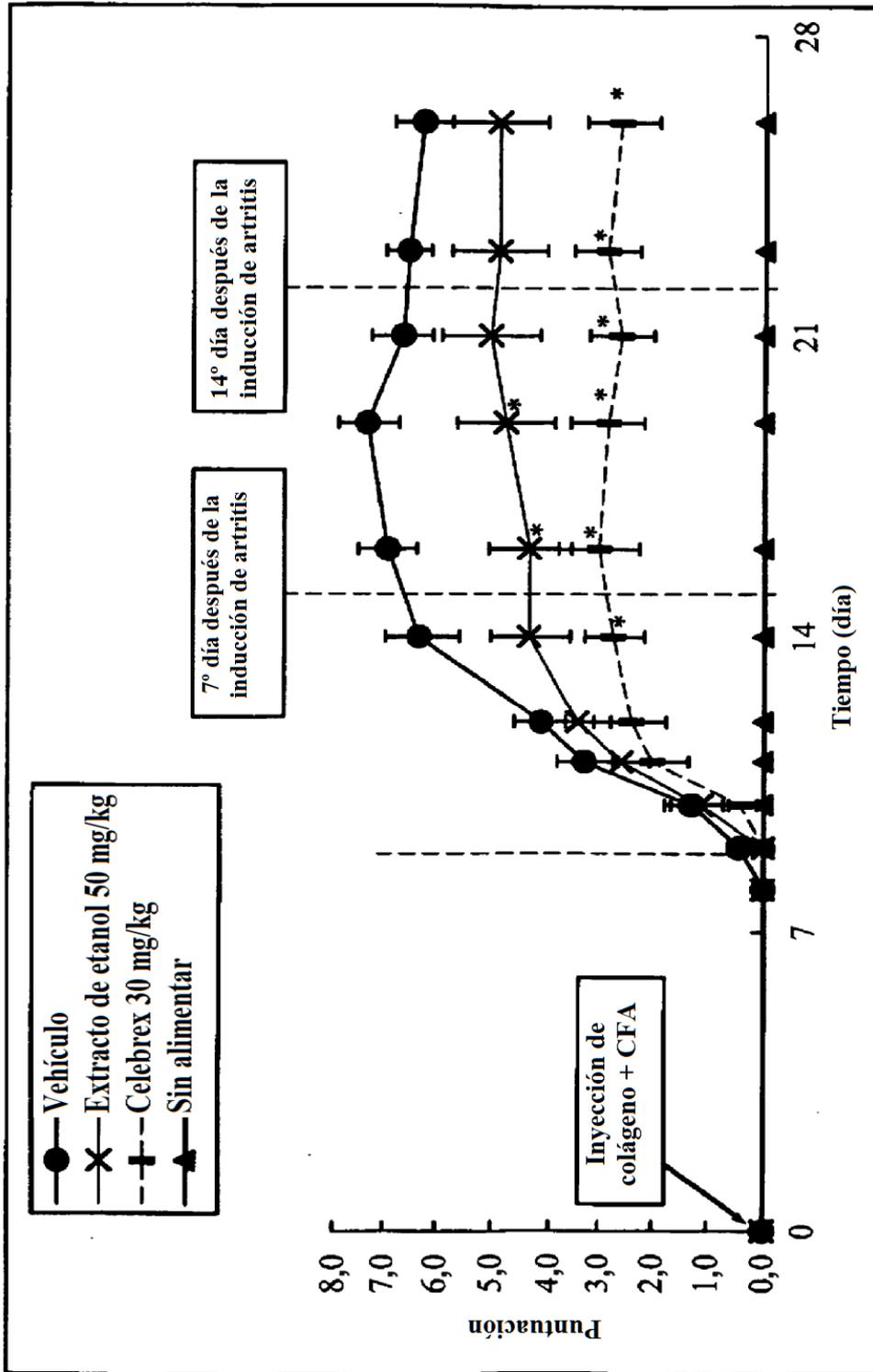


FIG. 11

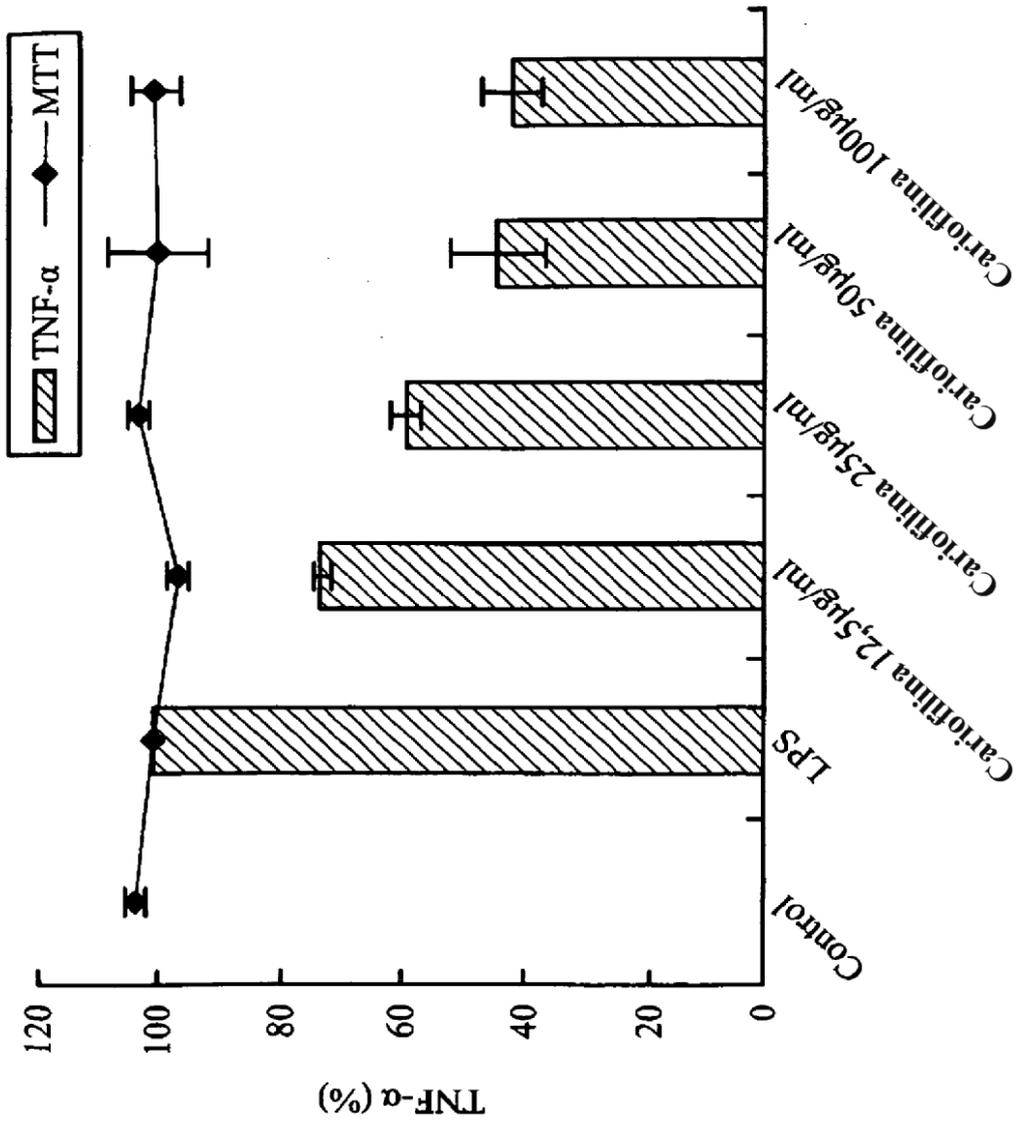


FIG. 12

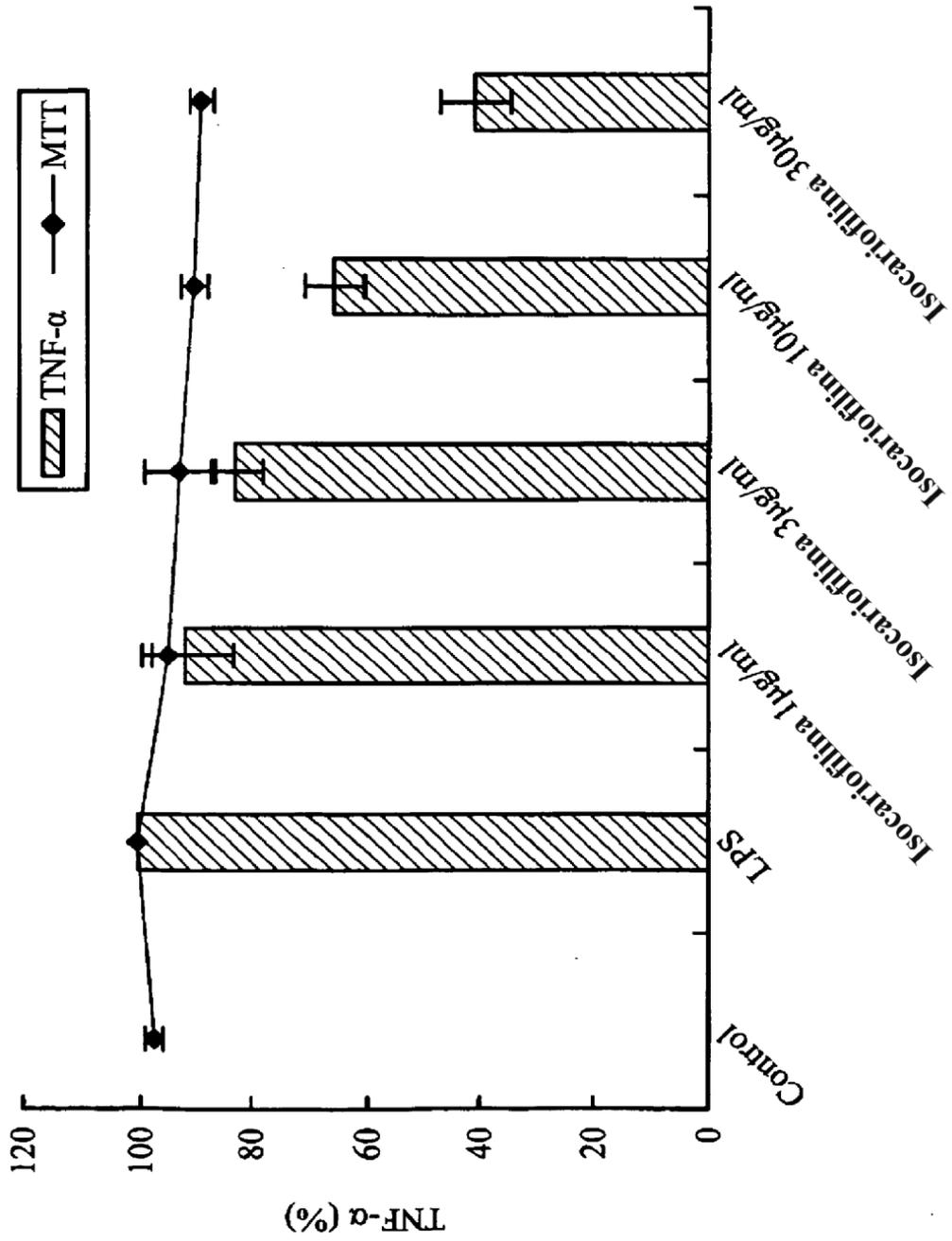


FIG. 13

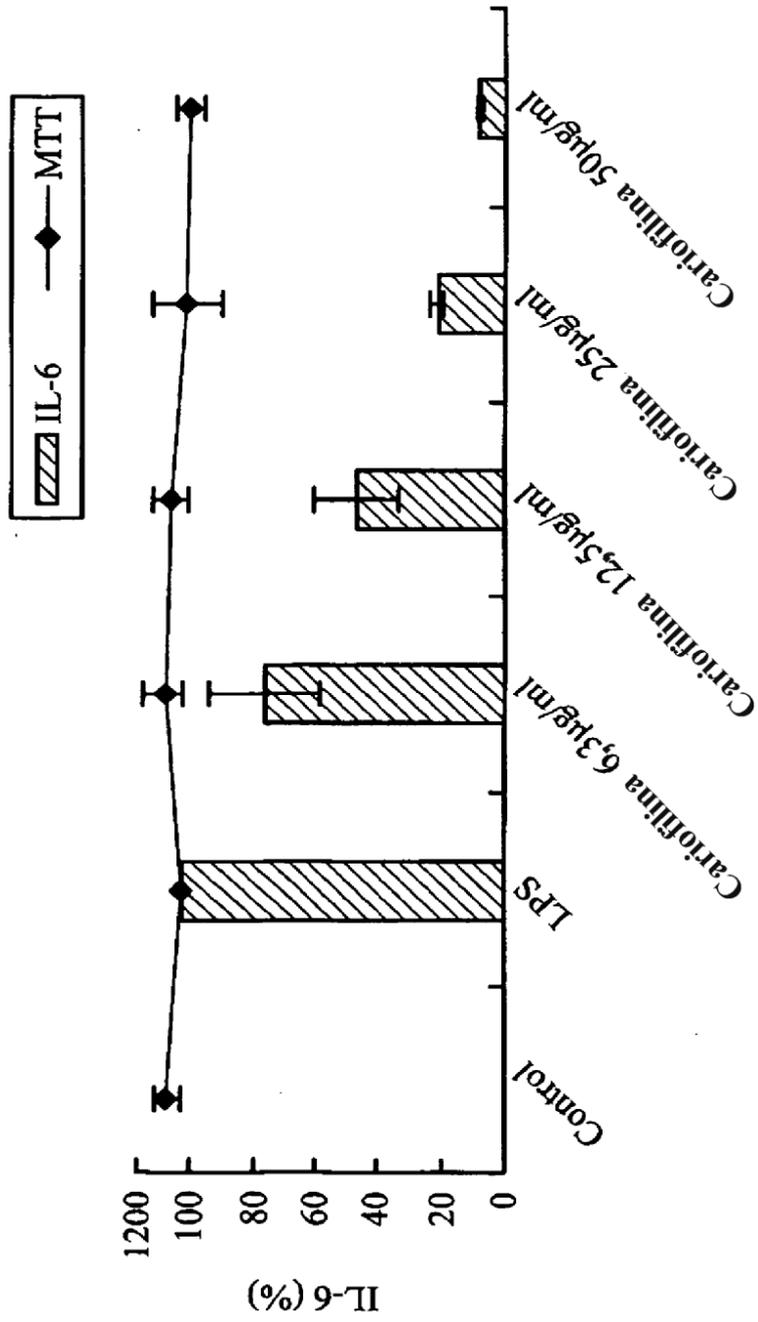


FIG. 14

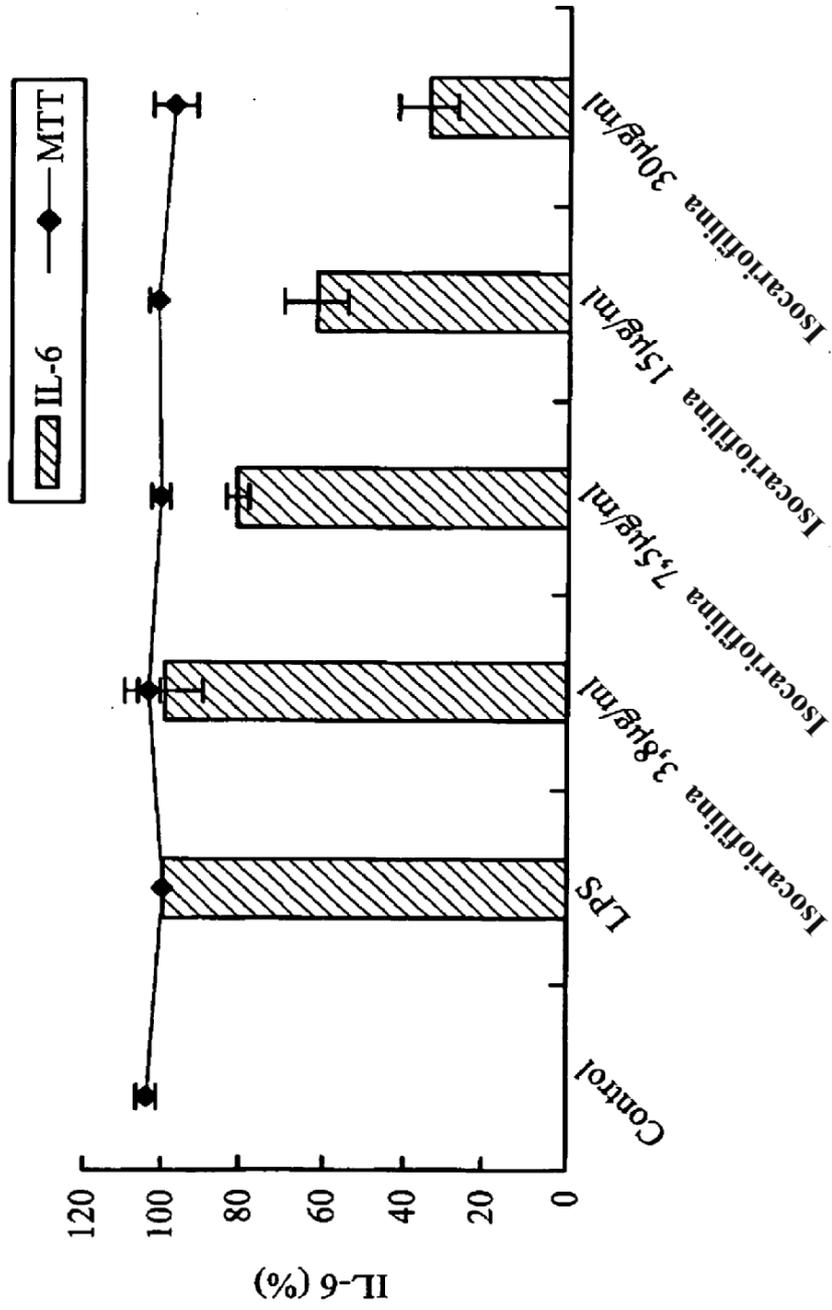


FIG. 15