

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 766**

51 Int. Cl.:

A61K 36/14 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2012 PCT/KR2012/005221**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13005956**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2012 E 12808207 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2727599**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende un extracto de Chamaecyparis obtusa para usar previniendo y aliviando trastornos de la motilidad intestinal**

30 Prioridad:

01.07.2011 KR 20110065685

04.08.2011 KR 20110077932

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

27.03.2017

73 Titular/es:

**ECODERM, INC. (100.0%)
Bldg 2, Suite 21, Chonnam National University
Medical School, Hak-dong 5, Dong-gu
Gwangju 501-746, KR**

72 Inventor/es:

KIM, SEONG JIN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 606 766 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 un extracto de *Chamaecyparis obtusa* para usar previniendo y aliviando trastornos de la motilidad intestinal

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para prevenir y mejorar los trastornos de la motilidad de un tracto gastrointestinal, y más particularmente, a una composición farmacéutica que es efectiva en la prevención y tratamiento de trastornos de la motilidad del tracto intestinal usando extracto de *Chamaecyparis obtusa* y una composición alimentaria que se puede usar como alimento.

Técnica anterior

- 10 Se puede usar un regulador de la motilidad del tracto gastrointestinal para la indigestión o estreñimiento funcional, síntomas de intestino irritable, trastornos de la motilidad gastrointestinal diabéticos, trastornos de la motilidad gastrointestinal quimioterapéuticos, obstrucción intestinal debida a trastornos de la motilidad del tracto digestivo, o trastornos de la motilidad del tracto gastrointestinal de pacientes de distrofia miotónica.

- 15 La motilidad del tracto gastrointestinal está regulada por el sistema nervioso extrínseco tal como los nervios simpáticos o nervios parasimpáticos, el sistema nervioso intrínseco en el tracto gastrointestinal, o factores intrínsecos o fármacos. Además, factores autónomos del tracto gastrointestinal, tales como actividad espontánea del músculo liso intestinal y células intersticiales de Cajal (ICC), están también implicados en la motilidad gastrointestinal.

- 20 La intensa investigación realizada con modelos animales durante la pasada década reveló que las funciones de un marcapasos en los músculos lisos que demuestran el movimiento fásico típico en el estómago, intestino delgado e intestino grueso se originan en las ICC (Huizinga JD, Zarate N, Farrugia G. Physiology, Injury, and Recovery of Interstitial Cells of Cajal: Basic and Clinical Science, Gastroenterology, 2009 November; 137(5): 1548-56).

- 25 La ICC es conocida como una pequeña célula para controlar la motilidad del tracto gastrointestinal, y las funciones fisiológicas de la ICC incluyen: 1) la inducción de lentas ondas que provocan la contracción espontánea del músculo liso; 2) que es responsable de la propagación de ondas lentas desde una porción del tracto gastrointestinal; 3) la implicación en la neurotransmisión entre las terminaciones nerviosas y los músculos lisos; y 4) servir como modulador del estímulo sensorial, tal como un receptor de estiramiento.

- 30 La ICC expresa un gen de c-kit que es un proto-oncogen, y se usan ensayos inmunohistoquímicos para identificar ICC en tejidos. Además, se sabe que un factor de células madre (SCF) del ligando c-kit es esencial para el desarrollo de ICC.

- 35 Actualmente, la investigación en las ICC se efectúa en su mayor parte morfológicamente. Por consiguiente, una reducción del número de ICCs y un cambio morfológico de ICC se observan clínicamente en la obstrucción intestinal, acalasia, enfermedad de Hirschsprung, estreñimiento crónico, y trastornos del tracto gastrointestinal diabéticos, lo que sugiere que los trastornos de movimiento provocados por enfermedades asociadas a la motilidad gastrointestinal están íntimamente relacionados con la ICC (Ohlsson B, Veress B, Lindgren S, Sundkwist G. Enteric ganglioneuritis and abnormal interstitial cells of Cajal: Features of inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2007 Jun; 13(6): 721-6./ Ordog T. Interstitial cells of Cajal in diabetic gastroenteropathy. Neurogastroenterol Motil. 2008 Jan; 20(1): 8-18).

- 40 El documento KR 2007 0057108 se refiere a un extracto que muestra excelente actividad antifúngica sin citotoxicidad, siendo usado por ello como medicinas y alimentos para prevenir y tratar varias infecciones fúngicas.

El documento KR 2009 0075950 se refiere a una composición para tratar dermatitis atópica incurable para aliviar la irritación de la piel estimulando material y tratar la dermatitis atópica que acompaña al prurito y la erupción cutánea.

Descripción de la invención

- 45 La presente invención está definida por las reivindicaciones. Para superar los inconvenientes anteriormente mencionados, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso para prevenir y mejorar los trastornos de la motilidad de un tracto gastrointestinal usando extracto de *Chamaecyparis obtusa*. Más particularmente, el objetivo de la presente invención es confirmar que la motilidad del tracto gastrointestinal se puede regular cambiando la actividad eléctrica de ICC.

- 50 Para conseguir los objetivos de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso para prevenir y mejorar los trastornos de la motilidad de un tracto gastrointestinal, comprendiendo la composición farmacéutica extracto de *Chamaecyparis obtusa* contenido como único ingrediente activo.

Los trastornos de la motilidad del tracto gastrointestinal se pueden prevenir y mejorar variando la actividad eléctrica de las células intersticiales de Cajal (ICC)

El extracto de *Chamaecyparis obtusa* se puede obtener extrayendo por lo menos una de hojas, troncos y ramas de *Chamaecyparis obtusa* usando un método de extracción con fluido supercrítico o un método de extracción con agua caliente.

5 El método de extracción con fluido supercrítico se puede efectuar durante 30 a 240 minutos aplicando dióxido de carbono como fluido supercrítico a una temperatura de 35 a 45°C a una presión de 100 a 500 bar.

Efecto(s) ventajoso(s)

10 Como se describe anteriormente, según la presente invención, las enfermedades asociadas a los trastornos de la motilidad del tracto gastrointestinal, tales como indigestión o estreñimiento funcional, síntomas de intestino irritable, trastornos de la motilidad gastrointestinal diabéticos, trastornos de la motilidad gastrointestinal quimioterapéuticos, obstrucción intestinal debida a trastornos de la motilidad del tracto digestivo, o trastornos de la motilidad del tracto gastrointestinal de pacientes de distrofia miotónica, se pueden prevenir y mejorar. Más particularmente, la motilidad del tracto gastrointestinal se puede regular efectivamente cambiando la actividad eléctrica de las ICC.

Breve descripción de los dibujos

15 Los objetos, características y ventajas de la presente invención serán más evidentes con la siguiente descripción detallada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

Las FIGS. 1 a 4 son gráficos que ilustran resultados de análisis de GC/MS de extracto de *Chamaecyparis obtusa* según realizaciones ejemplificadas de la presente invención; y

La FIG. 5 es un gráfico que ilustra un cambio en la actividad eléctrica cuando el extracto de *Chamaecyparis obtusa* según una realización de la presente invención se trata con células intersticiales de Cajal (ICC).

20 Mejor modo de llevar a cabo la invención

De aquí en adelante, se describirá con detalle una composición farmacéutica para su uso para prevenir y tratar trastornos de la motilidad de un tracto gastrointestinal según una realización preferida de la presente invención.

25 La composición farmacéutica para su uso para prevenir y tratar trastornos de la motilidad de un tracto gastrointestinal según una realización preferida de la presente invención incluye extracto de *Chamaecyparis obtusa* como un único ingrediente activo.

30 El extracto de *Chamaecyparis obtusa* se puede extraer por varios métodos. Por ejemplo, se puede aplicar un disolvente de extracción a hojas, troncos o ramas de la *Chamaecyparis obtusa* para extracción con agua caliente, extracción con aguja fría o termoaguja. En este caso, el disolvente de extracción se añade a la *Chamaecyparis obtusa* de 2 a 20 veces en una relación en peso para mezclar a continuación, seguido de extracción a 10 a 150 durante 1 a 24 horas. Aquí, se puede usar como disolvente de extracción por lo menos uno seleccionado del grupo que consiste en agua, alcoholes inferiores de C1-C4, polialcoholes o sus mezclas. Los alcoholes inferiores de C1-C4 pueden incluir metanol, etanol, etc. Los polialcoholes pueden incluir butilenglicol, propilenglicol, pentilenglicol. Las mezclas pueden incluir una mezcla de agua y un alcohol inferior, una mezcla de agua y un polialcohol, una mezcla de agua y un alcohol inferior y un polialcohol, o una mezcla de agua, un alcohol inferior y un polialcohol.

35 Además, el extracto de *Chamaecyparis obtusa* se puede obtener usando extracción a reflujo, extracción ultrasónica o extracción con fluido supercrítico. Además, el extracto de *Chamaecyparis obtusa* también puede incluir extractos obtenidos por los métodos de extracción indicados anteriormente y purificación general. Por ejemplo, el extracto de *Chamaecyparis obtusa* puede incluir también fracciones activas obtenidas por un método de extracción que usa una membrana de ultrafiltración que tiene un valor de corte de peso molecular constante, una variedad de métodos de extracción basados en cromatografía, una variedad de métodos de purificación efectuados adicionalmente.

40 La extracción de *Chamaecyparis obtusa* según una realización preferida de la presente invención se extrae de por lo menos una de hojas, troncos y ramas de *Chamaecyparis obtusa* usando extracción con agua caliente o extracción con fluido supercrítico. En particular, la extracción de *Chamaecyparis obtusa* se extrae preferentemente utilizando la extracción con fluido supercrítico.

45 En un ejemplo de la extracción con agua caliente, el agua se puede añadir de 5 a 15 veces en una relación en peso a *Chamaecyparis obtusa*, seguido de extracción a de 80 a 120°C durante de 5 a 20 horas.

50 La extracción con fluido supercrítico exhibe una alta eficiencia de extracción debido a la baja viscosidad de un fluido supercrítico usado y a la alta eficiencia de penetración y a una alta velocidad de extracción debido a un alto coeficiente de difusión. Además, la extracción con fluido supercrítico se realiza a una temperatura relativamente baja, evitando por ello daños térmicos. Además, la extracción con fluido supercrítico tiene una ventaja por el hecho de que los residuos de extracción y el disolvente se pueden separar fácilmente debido a una gran diferencia de densidad entre la muestra y el fluido supercrítico.

El fluido supercrítico es un fluido mantenido a alta temperatura y presión aplicando temperatura y presión críticas a

un material diana supercrítico, tal como dióxido de carbono, agua, alcohol o helio. El fluido supercrítico tiene substancialmente la misma densidad que un líquido, una viscosidad próxima a la de un gas y una difusividad aproximadamente 100 veces mayor que los líquidos típicos. Se permite que el fluido supercrítico penetre en un objetivo de extracción, obteniendo por ello un extracto de alta pureza.

5 En la presente invención, se puede usar dióxido de carbono como fluido supercrítico, y las condiciones de extracción preferidas incluyen de 35 a 45°C, de 100 a 500 bares de presión y de 30 a 240 minutos de tiempo de extracción. Cuanto mayor es la presión, mayor es la eficiencia de extracción. En este caso, sin embargo, el contenido de ingredientes fitoncidas se reduce. Por lo tanto, la presión para aumentar el contenido de ingredientes fitoncidas que tienen un peso molecular pequeño está preferentemente en un intervalo de 150 a 200 bar.

10 Para el preprocesado de la extracción supercrítica, se puede realizar la limpieza, secado y pulverización de *Chamaecyparis obtusa*. Con el fin de evitar que se volatilicen los ingredientes fitoncidas de *Chamaecyparis obtusa*, el secado es preferentemente secado con aire frío a baja temperatura o liofilización.

15 Durante la extracción supercrítica, se puede usar un fluido mixto que tiene un codisolvente mezclado adicionalmente con dióxido de carbono como fluido supercrítico. El codisolvente puede ser por lo menos uno de etanol, metanol, agua, acetato de etilo, hexano y éter dietílico. Específicamente, se usa preferentemente de 80% a 100% de etanol como codisolvente

La composición farmacéutica para regular la motilidad del tracto gastrointestinal según la presente invención puede comprender de 0,01 a 99% en peso, preferentemente de 0,05 a 50% en peso, de extracto de *Chamaecyparis obtusa*, basado en el peso total de la composición farmacéutica.

20 La composición farmacéutica según la presente invención puede incluir una formulación en forma de preparación oral tal como polvo, gránulos, comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones o jarabes, inyectables, inhalantes, supositorios o parches.

La composición farmacéutica según la presente invención puede incluir adicionalmente un vehículo, excipiente o diluyentes farmacéuticamente aceptables según la forma deseada de formulación.

25 En un caso de administración oral, la composición farmacéutica según la presente invención puede incluir, por ejemplo, un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un aglomerante (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); una carga (por ejemplo, lactosa, lactosa, celulosa microcristalina, fosfato de calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, etc.), un agente desintegrante (por ejemplo, almidón de patata, almidonglicolato de sodio, etc.); o un agente humectante (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, etc.). Representativamente, la composición farmacéutica según la presente invención puede incluir gránulos, polvo, comprimidos, cápsulas, que son formas de dosificación sólida. Específicamente, los comprimidos o las cápsulas se pueden revestir por un método conocido en la técnica relacionada.

35 Las formulaciones líquidas para administración oral pueden incluir, por ejemplo, jarabes, emulsiones o suspensiones, o pueden existir en forma de productos secos para combinar con agua u otros vehículos apropiados antes del uso.

40 Las formulaciones líquidas pueden incluir adicionalmente aditivos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, una formulación en suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, grasa comestible hidrogenada, etc.); un emulsionante (por ejemplo, lecitina, goma arábica, etc.), un vehículo no acuoso (por ejemplo, aceite de almendra, éster aceitoso, alcohol etílico, etc.); o un agente antiséptico (por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo, ácido sórbico, etc.). Preferentemente, los endulzantes farmacéuticamente aceptables pueden incluir por lo menos un endulzante, por ejemplo, sacarina, sacarina de sodio, sacarina de calcio, aspartamo, acesulfamo, ciclamato de sodio y potasio, alitamo, endulzante de dihidrocalcona, monelina, esteviosa o sucralosa (4,1',6'-triclora-4,1',6'-trideoxigalactosucrosa), y un endulzante a granel arbitrario (por ejemplo, sorbitol, manitol, fructosa, sacarosa, maltosa, isomaltosa, glucosa, jarabe de glucosa hidrogenada, xilitol, caramelo, miel, etc.).

45 Una formulación no oral incluye disolución acuosa esterilizada, un disolvente no acuoso, una suspensión, un emulsionante, un agente de liofilización, un supositorio etc. Propilenglicol, polietilenglicol, un aceite vegetal tal como aceite de oliva, éster inyectable tal como oleato de etilo se pueden usar como disolvente no acuoso y la suspensión. Se puede usar witepsol, macarogol, tween 61, manteca de cacao, manteca de laurina o glicerogelatina como base de supositorio.

55 Las dosis deseadas de la composición farmacéutica según la presente invención pueden variar según el estatus y peso corporal de un paciente, gravedad de la enfermedad, forma de fármaco, vía y periodo de dosificación, etc., pero también se pueden seleccionar apropiadamente por un experto en la técnica. Por ejemplo, la composición farmacéutica según la presente invención se puede administrar en una dosis de 0,0001 a 100 mg/kg, preferentemente de 0,001 a 100 mg/kg, por día. La dosis de la composición farmacéutica según la presente invención se puede administrar una vez al día o varias veces al día.

La composición farmacéutica según la presente invención se puede administrar a mamíferos incluyendo ganado y seres humanos por varias vías. La composición farmacéutica según la presente invención se puede administrar por vía oral, rectal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intravaginal, transdérmica, endocraneal o inyección intracerebral.

5 Los ejemplos del aditivo alimentario pueden incluir sacáridos tales como un monosacárido, un disacárido, un polisacárido o un alcohol de azúcar, un agente saborizante tal como taumatina, un extracto de estevia, sacarina o aspartamo, un suplemento nutricional, vitaminas, electrólito comestible, un agente saborizante, un agente colorante, un potenciador (por ejemplo, queso, chocolate, etc.), ácido péctico, ácido alginico, ácido orgánico, agente espesante coloidal protector, un regulador del pH, un estabilizante, un agente antiséptico, glicerina, alcohol y carbonizador.

10 Los ejemplos de la bebida pueden incluir de 0,01 a 60% en peso de extracto de *Chamaecyparis obtusa*, de 5 a 70% en peso de agua purificada, de 0,1 a 5% en peso de taurina, de 0,1 a 5% en peso de ácido cítrico, de 0,1 a 5% en peso de vitamina A, de 0,1 a 5% en peso de vitamina B y de 10 a 20% en peso de carbohidrato. Los ejemplos del carbohidrato pueden incluir azúcar en general que incluye un monosacárido tal como glucosa o fructosa, un disacárido tal como maltosa o sacarosa, y un polisacárido tal como dextrina o ciclodextrina, xilitol, sorbitol, eritritol, etc.

La formulación sólida tal como gránulos, polvo, comprimidos o cápsulas puede incluir de 0,01 a 60% en peso de extracto de *Chamaecyparis obtusa* y puede incluir adicionalmente adhesivos, vitaminas y carbohidratos adicionales.

De aquí en adelante, se proporcionan los siguientes ejemplos para una mejor comprensión de la presente invención, pero los ejemplos se proporcionan simplemente como una de varias realizaciones y se pretende que sean ejemplares, no exhaustivos.

Ensayo de extracción

1. Recogida y pre-procesado de muestras

Se usaron en este ensayo árboles que crecen en el área de Jangsung, la parte sur de Korea. Los árboles de *Chamaecyparis obtusa* recogidos en octubre de 2010 se compraron en Jangsung *Chamaecyparis Obtusa* Farming Union Corporation y se usaron en el ensayo.

Las hojas de *Chamaecyparis obtusa* se aislaron y lavaron con agua para retirar materiales extraños, se introdujeron en una bolsa de plástico de polietileno y se sellaron para almacenamiento en una habitación de almacenamiento fría a 4°C para ser usadas como muestra. Se empleó secado con aire frío a baja temperatura. El secado con aire frío a baja temperatura se efectuó usando un secador de aire frío a baja temperatura (GCT-0615. Green Cool Tech) a 35°C durante alrededor de 24 horas. Las hojas de *Chamaecyparis obtusa* secas se pulverizaron usando un mezclador para ser extraídas a continuación usando un dispositivo de extracción con fluido supercrítico.

2. Condiciones del procedimiento de extracción

Se extrajo la muestra de *Chamaecyparis obtusa* pre-procesada (es decir, hojas de *Chamaecyparis obtusa* pulverizadas) usando equipo (SCFE-0500, Il-shin Autoclave, Co., Ltd., Corea) para la extracción con fluido supercrítico (Extracción con fluido supercrítico CO₂ (0,5 l)).

Antes de inyectar la muestra en un recipiente de cristalización, la temperatura del recipiente de cristalización se precalentó a 40°C. Si la temperatura del recipiente de cristalización se estabiliza a 40°C, se inyectó la muestra de *Chamaecyparis obtusa* en el recipiente de cristalización usando una bomba de alta presión, y se inyectó una cantidad predeterminada de un antisolvente (CO₂) a través de una conducción superior hasta que la presión del recipiente de cristalización alcanzó una presión de ensayo de 100 a 500 bar. Mientras se inyectaba el gas, se controlaba una válvula de modo que la presión del recipiente de cristalización variara linealmente. En un tiempo predeterminado (de 30 a 240 min) después de inyectar el gas, la válvula instalada en una porción inferior del recipiente de cristalización se abre para la expulsión lenta de gas, mientras se inyecta CO₂ puro gaseoso desde una parte superior del recipiente de cristalización, manteniendo por ello la presión del recipiente de cristalización a un nivel constante. Después de que se inyectó el CO₂ puro gaseoso, se redujo la presión, produciendo el extracto de *Chamaecyparis obtusa*.

3. Eficiencia de extracción del extracto de *Chamaecyparis obtusa*.

Para investigar la eficiencia de extracción del extracto de *Chamaecyparis obtusa* según las condiciones de extracción, la temperatura de extracción se fijó a 40°C, se calcularon los rendimientos (%) de extracción dependientes del tiempo para varias presiones de extracción y el resultado se muestra en la Tabla 1. El rendimiento de extracción (%) se calculó usando la fórmula, cantidad de extracción (g) / dosis de muestra (g) x 100.

La cantidad de extracción (g) se calculó restando la cantidad de muestra después de la extracción de la dosis de muestra.

Tabla 1

		Tiempo de extracción (min)							
		30	60	90	120	150	180	210	240
Presión de extracción (bar)	100	65%	74%	87%	97%	99%	99%	100%	100%
	150	61%	76%	78%	80%	90%	93%	97%	100%
	200	68%	80%	85%	90%	92%	93%	96%	100%
	250	64%	75%	81%	85%	92%	95%	98%	100%
	300	57%	68%	76%	84%	88%	91%	96%	100%
	400	54%	63%	76%	88%	93%	97%	100%	100%
	500	55%	68%	74%	81%	88%	95%	98%	100%

Refiriéndonos a la Tabla 1, con la misma presión, la eficiencia de extracción se incrementó con el paso del tiempo. En general, se confirmó que en un caso de extracción con agua caliente, el rendimiento de extracción era menos del 5%, y en un caso de extracción con fluido supercrítico, el rendimiento de extracción era muy alto.

5

4. Análisis de ingredientes de extracto de *Chamaecyparis obtusa*

La muestra de extracto de *Chamaecyparis obtusa* extraída se agitó totalmente en hexano y se retiraron las partículas flotantes usando un dispositivo de centrifugación y se filtró usando un microfiltro (0,45 µm) para preparar el extracto de *Chamaecyparis obtusa*. El análisis de ingredientes del extracto de *Chamaecyparis obtusa* se llevó a cabo usando equipo de GC/MS (240-MS, Varian) en las siguientes condiciones: columna VF-5 ms (30 mm x 0,25 mm x 0,25 mm), He (1 ml/min) como gas portador, temperatura de inyección de 250°C, rampa de elevación de la temperatura del horno de 50 a 300°C/3°C, volumen de inyección de 1 µl y una relación de división de 10:1 como modo de inyección. Los ingredientes se pesaron cuantitativamente usando un detector selectivo de masas (MDS) con un intervalo de masa de 28 a 550 en un modo de barrido para la adquisición.

10

Primero, las retenciones de los ingredientes del extracto de *Chamaecyparis obtusa* se extrajeron en las condiciones de extracción de 40°C, 150 bar y 180 min, se midieron y se mostraron en el gráfico de GC/MS de la FIG. 1. Las retenciones medidas se compararon con el tiempo de retención de 33 tipos de materiales estándar de fitoncidas y los resultados del análisis cualitativo del extracto de *Chamaecyparis obtusa* se muestran en la Tabla 2.

15

Tabla 2

Substancia	RT (min)	Substancia	RT (min)	Substancia	RT (min)
Canfeno	10,881	Acetato de isobornilo	18,832	Alfa-gurgeneno	32,781
Sabineno	11,998	Tujona	20,315	Alfa-(-)cedreno	33,136
B-(-)-pineno	12,204	Terpineno-4-ol	22,504	Trans-(-)cariofileno	33,289
Mirceno	12,913	Alfa-terpineol	23,229	Beta-cariofileno	33,29
Felandreno	13,716	Acetato de alfa-fenchilo	24,276	Beta-chamigreno	35,855
Alfa-terpineno	14,262	Acetato de bornilo	27,39	Nelirisobutirato	36,031
4-cimeno	14,662	Alfa-tujona	27,502	Cis-nerolidol	37,859
Limoneno	14,851	Longifoleno	32,857	Trans-nerolidol	39,065
r-Terpineno	16,385	Longipineno	30,279	Cis-(benzoato de hexenilo)	39,508
Terpinoleno	17,755	Acetato de linalilo	25,79	Cedrol	40,913
Linalol	18,505	isolongifoleno	32,158	Eudesmol. B.	42,661

20

Refiriéndonos a la FIG. 1 y Tabla 1, se confirmó que los ingredientes principales del extracto de *Chamaecyparis obtusa* eran idénticos a los ingredientes fitoncidas. Los ingredientes fitoncidas contenidos en el extracto de *Chamaecyparis obtusa* exhibían en su mayoría picos a 40 min o menos.

5 Además, se confirmó que muchos picos se mostraron incluso después de 40 min a más altas presiones de extracción. Esto es supuestamente debido a que los ingredientes de las hojas de *Chamaecyparis obtusa* que tienen mayores pesos moleculares se extrajeron a presiones más altas. Por lo tanto, para incrementar el contenido de ingredientes fitoncidas de alta volatilidad que tienen relativamente pequeños pesos moleculares (100-300), los ingredientes del extracto de *Chamaecyparis obtusa* se extraen preferentemente a relativamente baja presión, esto es, 200 bar o menos.

10 A continuación, las diferencias en el contenido de los ingredientes del extracto de *Chamaecyparis obtusa* se investigaron según el método de secado pre-procesado. La volatilización de los ingredientes fitoncidas altamente volátiles puede ocurrir en el secado, y se usaron dos tipos de métodos de secado, esto es, secado con aire frío a baja temperatura y liofilización.

15 El extracto de *Chamaecyparis obtusa* extraído de la muestra de *Chamaecyparis obtusa* secada por el secado con aire frío a baja temperatura (40°C, 150 bar, 180 min) y el extracto de *Chamaecyparis obtusa* extraído de la muestra de *Chamaecyparis obtusa* secada por liofilización (40°C, 150 bar, 180 min) se compararon y se muestra en el gráfico de GC/MS de la FIG. 2. La tabla 3 muestra los contenidos de los principales ingredientes del extracto de *Chamaecyparis obtusa*. La liofilización se efectuó secando hojas de *Chamaecyparis obtusa* usando un liofilizador (OPR-FDT-8650, OPERON) durante alrededor de 72 horas.

20 Tabla 3

Ingrediente	Contenido (%) durante la liofilización	Contenido (%) durante el secado con viento frío a baja temperatura
Alfa-pineno	0,633	0,676
Canfeno	0,092	0,106
Sabineno	6,685	8,471
(b)-pineno	0,13	0,116
Mirceno	0,957	1,109
Linomeno	1,451	1,608
Gamma-terpineno	0,733	0,758
Terpinoleno	0,371	0,423
Alfa-(acetato de fenchilo)	0,37	0,446
Acetato de linalino	0,507	0,679
Acetato de bornilo	3,038	3,074
Acetato de terpinilo	6,043	5,114
Alfa(-)-cedreno	0,358	0,323
Trans-cariofileno	0,366	0,423
Isobutirato de nerilo	1,328	1,552
Cis-nerolidol	0,324	0,298
Trans-nerolidol	1,205	0,801
Cedrol	1,594	1,457
Total	26,385	27,434

Refiriéndonos a la FIG. 2 y la Tabla 3, la extensión de la volatilización de los ingredientes respectivos variaba según el método de secado, pero el contenido de los ingredientes totales en el caso de secado con aire frío a baja

temperatura era 1% más alto que el del caso de liofilización. Por lo tanto, se confirmó que no había diferencia considerable en el contenido de ingredientes fitoncidas según el método de secado. Sin embargo, el secado con aire frío a baja temperatura era ligeramente más ventajoso en vista del contenido.

5 A continuación, para investigar la volatilidad y la extensión residual de ingredientes fitoncidas contenidos en el extracto de *Chamaecyparis obtusa*, se recogieron dos muestras de ensayo en una determinada cantidad del extracto de *Chamaecyparis obtusa* extraído de la muestra de *Chamaecyparis obtusa* secada por secado con aire frío a baja temperatura (40°C, 150 bar, 180 min), y una muestra se dejó reposar sin tocar en el aire y la otra se selló para almacenamiento. Después de 3 días, las respectivas muestras se disolvieron en hexano y a continuación se analizaron. Los resultados del análisis se muestran en el gráfico de GC/MS de la FIG.3, y los contenidos de los
10 ingredientes principales se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Ingrediente	Contenido (%) después de sellar durante 3 días	Contenido (%) después de 3 días
Alfa-pineno	0,62	0,00
Canfeno	0,10	0,00
Sabineno	7,83	0,01
(b)-pineno	0,11	0,00
Mirceno	1,02	0,00
Linomeno	1,49	0,01
Gamma-terpineno	0,65	0,02
Terpinoleno	0,37	0,03
Alfa-(acetato de fenchilo)	0,42	0,29
Acetato de linalino	0,65	0,54
Acetato de bornilo	2,98	2,65
Acetato de terpinilo	5,05	5,16
Alfa(-)-cedreno	0,32	0,30
Trans-cariofileno	0,41	0,41
Isobutirato de nerilo	1,52	1,62
Cis-nerolidol	1,06	1,24
Trans-nerolidol	0,95	1,10
Cedrol	1,44	1,68
Total	26,98	15,06

15 Refiriéndonos a la FIG. 3 y Tabla 4, cuando el extracto de *Chamaecyparis obtusa* se dejó reposar sin tocar en el aire durante 3 días, no se observaron picos antes de 20 min. Más del 95% de los ingredientes que muestran picos antes de 20 min se volatilizaron. Los ingredientes que muestran picos antes de 20 min tienen relativamente bajos pesos moleculares y la mayor parte de ellos se volatilizaron en 3 días, mientras que los ingredientes que muestran picos después de 40 min tienen peso molecular relativamente grande y la mayor parte de ellos permanecían sin ser volatilizados. Esta confirmación se hizo definitivamente a picos antes de 20 min, comparado con la muestra sellada y almacenada durante 3 días.

20 Además, se confirmó que algunos ingredientes que se dejaron reposar sin tocar durante 3 días en el aire, que incluyen cis-nerolidol, trans-nerolidol, cedrol, etc., permanecían en grandes cantidades, comparados con los ingredientes sellados y almacenados durante 3 días. De esto, se determina supuestamente que los ingredientes de alto peso molecular se concentraron mientras que los ingredientes de bajo peso molecular se volatilizaron.

De los resultados experimentales anteriormente descritos, se confirmó que las condiciones óptimas de extracción

para obtener grandes cantidades de extractos de *Chamaecyparis obtusa* que tienen alto contenido de ingredientes fitonocidas usando extracción con fluido supercrítico son 40°C de temperatura de extracción y de 150 a 200 bar de presión de extracción. El tiempo de extracción apropiado era de 30 a 240 min, preferentemente de 180 a 240 min cuando se tiene en consideración el rendimiento de extracción.

- 5 Mientras tanto, cuando el extracto de *Chamaecyparis obtusa* se extrajo de la muestra de *Chamaecyparis obtusa* seca por secado con aire frío a baja temperatura en las condiciones de 40°C, 150 bar, y 180 min entre las condiciones óptimas de extracción, se investigaron los cambios en los ingredientes dependiendo del número de ciclos de extracción. Con este fin, se analizaron los ingredientes del extracto de *Chamaecyparis obtusa* obtenidos por un ciclo de extracción (extracto de 1 ciclo) y del extracto de *Chamaecyparis obtusa* obtenido por dos ciclos continuos de extracción en las mismas condiciones (extracto de 2 ciclos). Los resultados del análisis se muestran en el gráfico de GC/MS de la FIG. 4 y los contenidos de ingredientes principales se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Ingrediente	Contenido (%) de producto de un ciclo de extracción	Contenido (%) de producto de dos ciclos de extracción
Alfa-pineno	0,268	0,545
Canfeno	0,0528	0,115
Sabineno	3,6192	6,392
(b)-pineno	0,0415	0,085
Mirceno	0,546	1,096
Linomeno	1,132	2,057
Gamma-terpineno	0,265	1,016
Terpinoleno	-	0,469
Alfa-(acetato de fenchilo)	0,5217	0,926
Acetato de linalino	0,524	1,197
Acetato de bornilo	3,514	7,632
Acetato de terpinilo	8,14	15,39
Alfa-(-)-cedreno	0,295	0,533
Trans-cariofileno	0,441	1,02
Isobutirato de nerilo	0,849	2,693
Cis-nerolidol	0,876	0,561
Trans-nerolidol	1,0326	2,473
Cedrol	1,485	1,25
Total	23,6028	45,45

- 15 Refiriéndonos a la FIG. 4 y la Tabla 5, alrededor de 23,6% de ingredientes fitonocidas se extrajeron por un ciclo de extracción y alrededor de 45,5% de ingredientes fitonocidas se extrajeron por dos ciclos de extracción. Por lo tanto, se confirmó que se podrían obtener ingredientes fitonocidas de alta pureza cuando se efectúa una re-extracción.

Ensayo de regulación de la motilidad del tracto gastrointestinal

- 20 La motilidad del tracto gastrointestinal se regula por el sistema nervioso extrínseco tal como los nervios simpáticos o nervios parasimpáticos, el sistema nervioso intrínseco en el tracto gastrointestinal, o factores intrínsecos o fármacos. Además, factores autónomos del tracto gastrointestinal, tales como la actividad espontánea en el músculo liso intestinal e ICC, también están implicados en la motilidad del tracto gastrointestinal. Este ensayo se efectúa para confirmar que la motilidad del tracto gastrointestinal se puede regular usando el extracto de *Chamaecyparis obtusa* que varía la actividad eléctrica de las ICC.

1. Aislamiento de ICC

Se usaron ratones Balb/C de 10 a 15 días de edad como animales de ensayo sin distinción de ratones machos y hembras, se anestesiaron con éter y se sacrificaron por dislocación cervical. A continuación, se abrió el abdomen por corte y se sacaron secciones de intestino grueso. Los órganos se retiraron por corte a un recipiente con disolución de bicarbonato Krebs-Ringer a temperatura ambiente. Después de fijar el tejido con un alfiler, se retiró la mucosa usando tijeras de microdissección bajo microscopio óptico para exponer a continuación el tejido muscular. El tejido muscular aislado se transfiere a una disolución de Hank que incluye colagenasa al 0,1% (Worthington Biochemical Co., Lakewood, USA), seroalbúmina bovina al 0,1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), e inhibidor de tripsina al 0,1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) sin Ca^{2+} , seguido de enfriamiento a temperatura constante a 37°C durante 13 minutos. A continuación, la disolución de reacción se repuso con una disolución de Hank sin Ca^{2+} y se agitó cuidadosamente usando una pipeta de vidrio con una punta roma para aislar células.

2. Cultivo de ICC

Las células aisladas se dividieron y colocaron en un vidrio de cubierta esterilizado revestido con colágeno murino (2,5 g/ml, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) en un recipiente de cultivo de 35 mm. Después de 10 minutos, se distribuyó una disolución de medio de cultivo de músculo liso (SmGm) (Clonetics Corp., San Diego, CA, USA) que contiene factor de células madre (SCF) (5 ng/ml, Sigma) y 2% de antibiótico/antimicótico (Gibco-BRL), seguido de cultivo en un cultivador de 95% de O_2 – 5% de CO_2 a 37°C. El día siguiente después del cultivo, se retiró solo el 2% de antibiótico/antimicótico de la disolución cultivada para cambiar una disolución de nutriente. Los experimentos se llevaron a cabo dos días después del cultivo. Las ICC cultivadas se identificaron usando un anticuerpo contra proteína kit (ACK2, Gibco-BRL), y se realizó inmunofluorescencia usando Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene OR, USA). Después de la inmunofluorescencia, las células se observaron usando microscopía de barrido láser confocal (FV300, Olympus, Japan).

3. Registro de la corriente y voltaje de la membrana celular

El medio cultivado se transfirió a un controlador de temperatura constante instalado en un microscopio invertido y se dejó fluir a su través una disolución extracelular a un caudal de 2 a 3 ml por minuto. Se realizó la fijación de toda la célula para registrar los voltajes de la membrana celular en un modo de fijación de la corriente y las corrientes de la membrana celular en un modo de fijación del voltaje. La salida de las señales del amplificador de fijación (Axopatch 1-D, Axon Instruments, Foster, CA, USA) se observaron por medio de un osciloscopio digital y un dispositivo de registro fisiológico. El ajuste de los registros de corrientes y voltajes fijos y de estimulación se realizó usando un pClamp (versión 6.0, Axon Instruments) y un ordenador compatible con IBM. Las corrientes de la membrana celular se registraron mientras se fija un voltaje de mantenimiento de -80 mV. Los experimentos se llevaron a cabo a 29°C.

4. Resultados

En un estado de corriente fija, el voltaje de la membrana celular medido de ICC era -57 ± 5 mV, y la frecuencia de la actividad era 5 ± 2 ciclos/min.

El extracto de *Chamaecyparis obtusa* extraído de la muestra de *Chamaecyparis obtusa* seca por secado con aire frío a baja temperatura (40°C, 150 bar, 180 min) se diluyó con agua para ajustar la concentración a 0,05%. La muestra con la concentración ajustada se administró a ICC. Como se confirma por el gráfico (A) de la FIG. 4 que muestra el resultado experimental, la frecuencia de aparición de voltajes de marcapasos de ICC se incrementó. Como se confirma por el gráfico (B) de la FIG. 5, en el que la concentración del extracto de *Chamaecyparis obtusa* se incrementó a 0,1%, la baja polarización del voltaje de la membrana incrementó la frecuencia de aparición de voltajes de marcapasos de ICC.

Como se describe anteriormente, los resultados experimentales confirmaron que el extracto de *Chamaecyparis obtusa* puede regular la motilidad del tracto gastrointestinal variando la actividad eléctrica de las ICC como células marcapasos del tracto gastrointestinal.

Aplicabilidad industrial

La presente invención se puede usar eficientemente como fármaco que es efectivo para prevenir y tratar enfermedades provocadas por trastornos de la motilidad de un tracto gastrointestinal, tales como indigestión o estreñimiento funcionales, síntomas de intestino irritable, trastornos de la motilidad diabéticos de un tracto gastrointestinal, trastornos de la motilidad quimioterapéuticos de un tracto gastrointestinal, obstrucción intestinal debida a trastornos de la motilidad del tracto digestivo, o trastornos de la motilidad del tracto gastrointestinal de pacientes con distrofia miotónica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para uso para prevenir y mejorar trastornos de la motilidad de un tracto gastrointestinal, la composición farmacéutica que comprende extracto de *Chamaecyparis obtusa* contenido en forma de un solo ingrediente activo, en la que el trastorno de la motilidad del tracto gastrointestinal se selecciona del grupo que consiste en indigestión o estreñimiento funcional, síntomas de intestino irritable, trastornos de la motilidad gastrointestinal diabéticos, trastornos de la motilidad gastrointestinal quimioterapéuticos, obstrucción intestinal debida a trastornos de la motilidad del tracto digestivo, o trastornos de la motilidad del tracto gastrointestinal de pacientes de distrofia miotónica.
- 10 2. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, en la que los trastornos de la motilidad del tracto gastrointestinal se previenen o mejoran variando la actividad eléctrica de las células intersticiales de Cajal (ICC).
3. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1 o 2, en la que el extracto de *Chamaecyparis obtusa* se obtiene extrayendo por lo menos una de hojas, tronco y ramas usando un método de extracción con fluido supercrítico o un método de extracción con agua caliente.
- 15 4. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 3, en la que el método de extracción con fluido supercrítico se realiza durante 30 a 240 minutos aplicando dióxido de carbono como fluido supercrítico a una temperatura de 35 a 45°C a una presión de 100 a 500 bar.

Fig.1

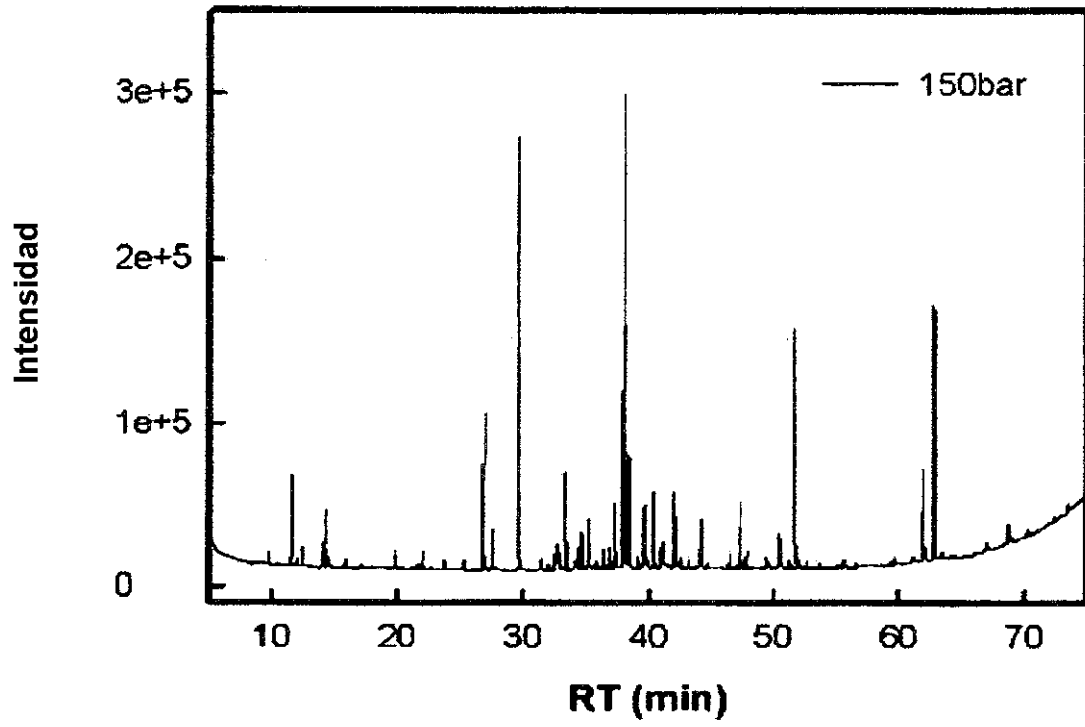


Fig.2

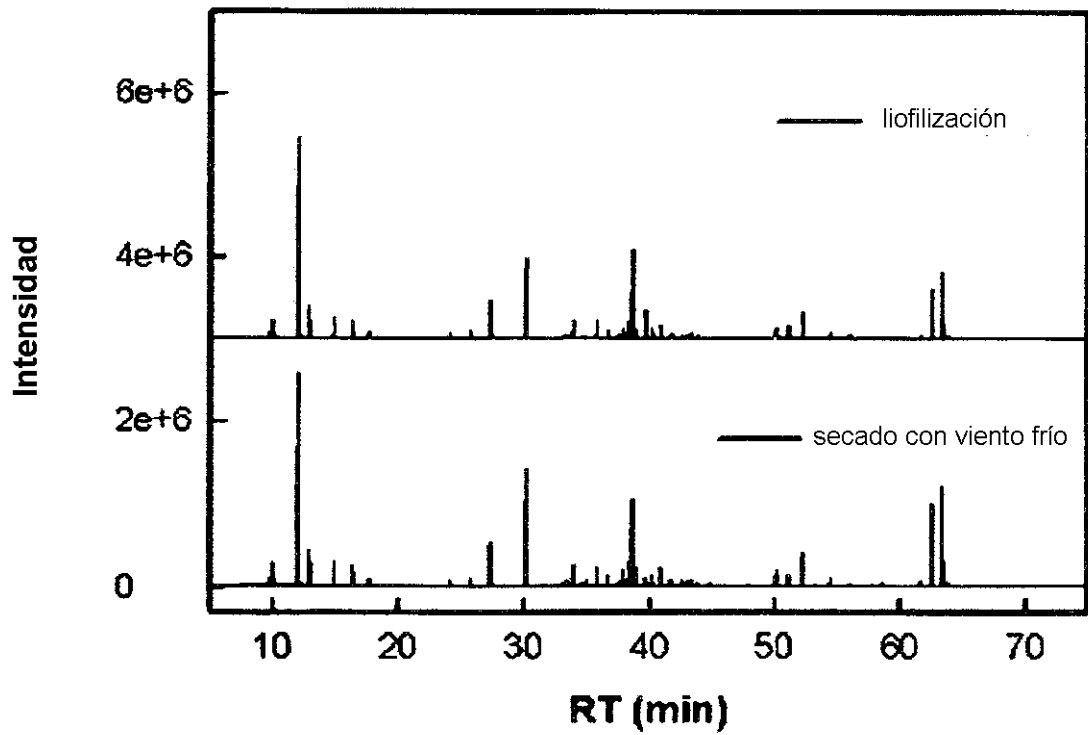


Fig.3

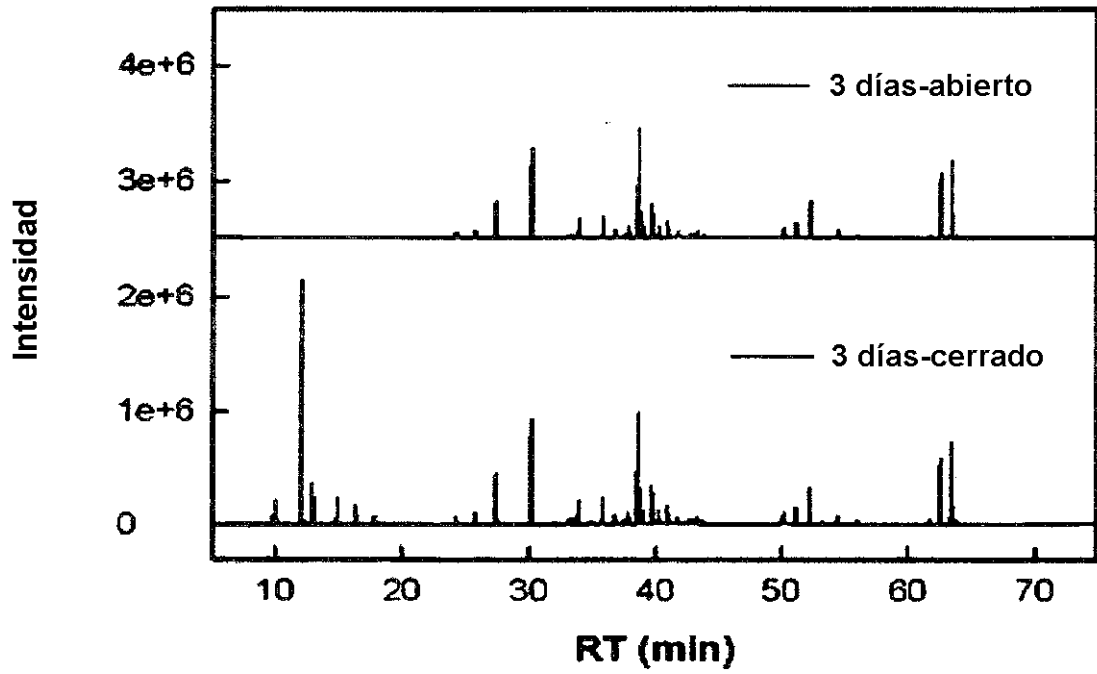


Fig.4

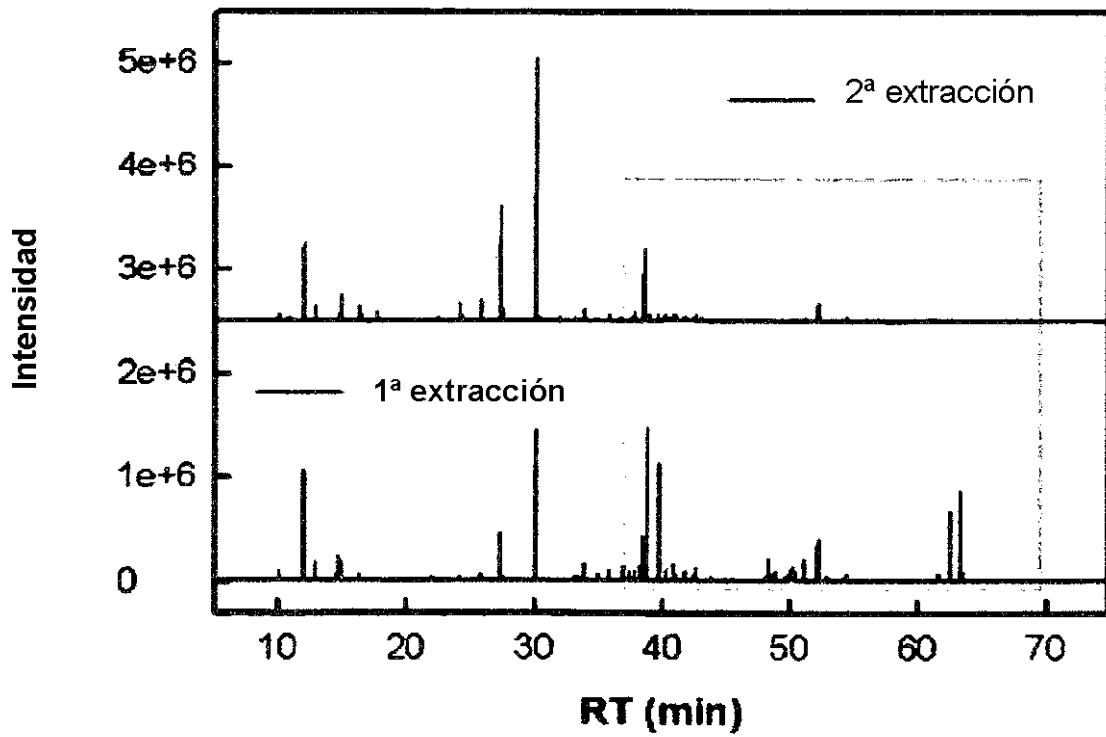


Fig.5

