

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 807**

51 Int. Cl.:

A61K 36/718 (2006.01)

A61K 36/25 (2006.01)

A61P 11/10 (2006.01)

A61P 11/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2009 PCT/KR2009/003170**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2009 WO09151300**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2009 E 09762686 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2307034**

54 Título: **Extracto de rhizoma coptidis y uso novedoso del mismo en el tratamiento de enfermedad respiratoria**

30 Prioridad:

13.06.2008 KR 20080055537

13.06.2008 KR 20080055538

10.04.2009 KR 20090031344

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.10.2017

73 Titular/es:

AHN-GOOK PHARMACEUTICAL CO., LTD.
(100.0%)

993-75 Daerim 2-dong Yeongdeungpo-gu
Seoul 150-072, KR

72 Inventor/es:

AUH, JIN;
KIM, CHANG-HWAN;
HAN, CHANG-KYUN;
YEON, SUNG-HUM;
SHIN, YOUNG-JUNE;
SHIN, MIN-KI y
CHANG, SOO-IM

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

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

ES 2 637 807 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

Extracto de rhizoma coptidis y uso novedoso del mismo en el tratamiento de enfermedad respiratoria

Campo de la Invención

5 Se proporciona un extracto de Rhizoma Coptidis o un extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra que es útil en actividades expectorantes, antitusivas y/o antihistamínicas. En particular, una composición antitusiva y/o expectorante y/o una composición para prevenir y tratar enfermedades respiratorias que comprende el extracto de Rhizoma Coptidis o el extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra como principio activo y un método de preparación de la misma.

Antecedentes de la Invención

10 Se sabe que la tos y el esputo son ocasionados por factores físicos o químicos, tales como aire frío, sustancias extrañas incluyendo microorganismos patológicos, contaminantes del aire, alérgenos y similares, y se pueden dividir de acuerdo con las siguientes causas:

15 Primera, si los receptores de la tos, en la laringe, tráquea, bronquios, faringe, senos paranasales, diafragma y similares, se estimulan por factores fisicoquímicos, la estimulación se lleva al centro de la tos en la médula del cerebro, por lo que ocurre el reflejo de la tos.

Segunda, si se activa el sistema nervioso parasimpático por factores físicos o químicos, un músculo liso del bronquio se contrae, por lo que se pueden dar síntomas tales como convulsión bronquial y broncoconstricción.

Tercera, los mediadores inflamatorios y similares se liberan de los mastocitos por factores físicos o químicos.

20 Por lo tanto, la eliminación de los factores anteriores puede suprimir la tos y el esputo. Sin embargo, la mayoría de los fármacos desarrollados hasta ahora principalmente son compuestos químicos sintéticos y así, ocasionan diversos efectos secundarios. Los fármacos naturales desarrollados para compensar tales defectos no pueden presentar excelente efecto para suprimir la tos y el esputo.

25 Mientras, el asma, que es una enfermedad respiratoria representativa, muestra repetida y espasmódicamente síntomas tales como dificultad para respirar, tos, respiración estridulosa y similares. El asma puede dividirse en asma cardíaco y asma bronquial. Aunque la tasa de incidencia del asma varía de acuerdo con un país, raza humana, edad y similares, en Inglaterra se informó en 2007 que aproximadamente 7,9 % de los adultos, 13,7 % de los niños y 9,4 % de los adultos mayores sufren de asma. En Corea, se ha incrementado la incidencia debido al cambio en el estilo de vida, la contaminación ambiental, el incremento en estrés y similares. Recientemente, se ha maximizado la gravedad del asma, puesto que la contaminación ambiental se vuelve seria, la edad de incidencia de asma disminuye y los síntomas duran más.

La obstrucción respiratoria, que es característica del asma, se da mediante 3 etapas. Específicamente, se contrae un músculo liso de los bronquios, la mucosa pulmonar se espesa y la mucosa pegajosa se juntan en los bronquios y bronquiolos, obstruyéndose de ese modo el tracto respiratorio. Entre estas etapas, únicamente se puede recuperar fácilmente la contracción del músculo liso de los bronquios.

35 En el mecanismo de ocurrencia del asma exógeno (alergénico), IgE es especialmente importante, e IgG en parte se refiere al mismo. IgE libera mediadores, tales como, histamina, SRS-A, ECF-A, NCF, PAF, Cinina, PG y similares, los cuales activan los mastocitos para ocasionar reacción de hipersensibilidad. El asma endógeno (no alergénico), aunque su mecanismo no se ha aclarado, parece ser mediado por el nervio autónomo. La estimulación de colina en pacientes endógenos ocasiona el aislamiento de un mediador tal como histamina de un mastocito directamente a través de los órganos diana, incremento en la secreción de células calciformes, expansión de vasos sanguíneos pulmonares y contracción de tráquea, bronquios y bronquiolos, incrementando de ese modo la convulsión bronquial y la secreción de moco.

40 Aún no se ha desarrollado el tratamiento fundamental del asma, y se desarrollan diversos métodos y fármacos para prevenir un espasmo y complicaciones; sin embargo, simplemente mejoran los síntomas y no pueden tratar fundamentalmente la enfermedad y pueden ocasionar serios efectos secundarios.

45 Con el fin de superar tales límites de los fármacos existentes, hay una demanda de desarrollo de fármacos novedosos capaces de tratar fundamentalmente la causa y mejorar eficazmente los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, están implicados diversos leucocitos y citoquinas y mediadores inflamatorios separados de los mismos en la enfermedad respiratoria y, por tanto, es difícil el tratamiento efectivo con un compuesto de un solo componente. Por lo tanto, el extracto natural que tiene diversos ingredientes y mecanismos puede ser un fármaco efectivo y, por tanto, existe una demanda de desarrollo de un fármaco basado en el extracto natural.

Descripción detallada de la Invención

Problema técnico

5 Como resultado de estudios para desarrollar antitusivos o expectorantes, los inventores de la presente identificaron que el extracto de Rhizoma Coptidis o extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra tiene excelentes actividades antitusivas, expectorantes y antihistamínicas para completar la presente invención.

Una realización proporciona un uso novedoso del extracto de Rhizoma Coptidis o extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra para eliminación de esputo, supresión de tos y/o tratamiento y/o prevención de enfermedades respiratorias.

10 Otra realización proporciona composición antitusiva o expectorante y/o una composición para prevenir y/o tratar enfermedades respiratorias, que comprende el extracto de Rhizoma Coptidis o extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra como principio activo.

Solución técnica

Una realización se refiere a un uso novedoso del extracto de Rhizoma Coptidis o extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra para eliminar esputo, suprimir tos y/o tratar y/o prevenir enfermedades respiratorias.

15 Otra realización se refiere a una composición antitusiva o expectorante y/o una composición para prevenir y/o tratar enfermedades respiratorias, que comprende el extracto de Rhizoma Coptidis o extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra como principio activo.

20 El Rhizoma Coptidis es una hierba perene que pertenece a la familia Ranunculaceae, y principalmente se usa su parte del rizoma. Se sabe que contiene berberina alcaloide, palmatina, coptisina, berberastina, magnoflorina y similares, como componentes farmacológicos principales.

Sin embargo, aún no se ha estudiado el efecto del extracto de Rhizoma Coptidis y una composición que contiene Rhizoma Coptidis sobre las actividades antitusivas, expectorantes y antihistamínicas.

25 Los inventores de la presente encontraron que el extracto de Rhizoma Coptidis tiene actividades antitusivas, expectorantes y antihistamínicas, y es efectivo en el tratamiento y/o prevención de enfermedad respiratoria, para completar la presente invención.

30 La hiedra pertenece a la familia Araliaceae y significa que es una planta que pertenece al género *Hedera* (*Hedera* spp.). Por ejemplo, puede incluir *Hedera algeriensis*, *Hedera azorica*, *Hedera canariensis*, *Hedera colchica*, *Hedera helix*, *Hedera hibernica*, *Hedera maderensis*, *Hedera nepalensis*, *Hedera pastuchowii*, *Hedera rhombea* y similares. Se han revelado los efectos antitusivos y expectorantes del extracto de hoja de hiedra seca; sin embargo, aún no se ha informado que cuando se administra el extracto de hoja de hiedra combinado con otros extractos herbales, se puede obtener un efecto sinérgico importante sin efectos secundarios.

35 Los inventores de la presente identificaron que la combinación de extracto de Rhizoma Coptidis y extracto de hoja de hiedra incrementa notoriamente el efecto antitusivo, efecto expectorante, efecto antihistamínico, efecto para suprimir broncoconstricción, efecto para suprimir hipersensibilidad de vías respiratorias, efecto para suprimir oclusión bronquial en tejido de pulmón y efecto para suprimir infiltración de células inflamatorias, comparado con cada extracto solo. Además, se sugiere la relación de mezcla óptima de extracto de Rhizoma Coptidis y extracto de hoja de hiedra que muestra efecto sinérgico máximo para las actividades farmacológicas.

40 Con el fin de maximizar los efectos sinérgicos para actividades antitusivas, expectorantes, antihistamínicas, supresión de broncoconstricción, supresión de hipersensibilidad de vías respiratorias, supresión de oclusión bronquial en tejido de pulmón y supresión de infiltración de células inflamatorias al mezclar extracto de Rhizoma Coptidis con extracto de hoja de hiedra, la relación de mezcla de extracto de hoja de hiedra y extracto de Rhizoma Coptidis es de 0,1:1 a 10:1, basado en el peso del contenido sólido (el peso de extracto de hoja de hiedra:el peso de extracto de Rhizoma Coptidis), preferiblemente de 0,2:1 a 5:1, más preferiblemente de 1:1 a 4:1, mucho más preferiblemente de 1,5:1 a 3,5:1, lo más preferiblemente 2,5:1 a 3,5:1. El término "contenido sólido" significa aquellos de los cuales se separa un disolvente usado para preparar el extracto.

50 El término "extracto" en la presente memoria significa un extracto crudo de Rhizoma Coptidis y/o hoja de hiedra y/o un extracto o fracción soluble en disolvente específico del extracto crudo y puede estar en forma de una solución, concentración o polvo. El término "extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra" significa tanto una mezcla de extracto de hoja de hiedra y extracto de Rhizoma de Coptidis obtenido respectivamente por extracción de hoja de hiedra y Rhizoma Coptidis como un extracto obtenido por extracción de una mezcla de hoja de hiedra y Rhizoma Coptidis.

El extracto de Rhizoma Coptidis es un extracto crudo obtenido por extracción de Rhizoma Coptidis con uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en alcohol lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 carbonos, o un extracto soluble en disolvente obtenido añadiendo al extracto crudo uno o más disolventes seleccionados del grupo

que consiste en una solución acuosa de alcohol lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 carbonos, preferiblemente solución acuosa de alcohol propílico, solución acuosa de alcohol isopropílico y alcohol butílico saturado con agua.

5 El extracto de hoja de hiedra puede ser un extracto crudo obtenido por extracción de hoja de hiedra seca con uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en agua y alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 4 carbonos, o un extracto soluble en disolvente obtenido añadiendo al extracto crudo uno más disolventes seleccionados del grupo que consiste en una solución acuosa de alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 6 carbonos, preferiblemente solución acuosa de alcohol propílico, solución acuosa de alcohol isopropílico y alcohol butílico saturado con agua. La hiedra usada para preparar el extracto de hoja de hiedra puede ser *Hedera* spp y, por ejemplo, puede ser una o más seleccionadas del grupo que consiste en *Hedera algeriensis*, *Hedera azorica*, *Hedera canariensis*, *Hedera colchica*, *Hedera helix*, *Hedera hibernica*, *Hedera maderensis*, *Hedera nepalensis*, *Hedera pastuchowii*, *Hedera rhombea* y similares, pero no se limita a las mismas.

10 El disolvente usado para preparar el extracto crudo de hoja de hiedra puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en agua, de 10 a 70 % (v/v), preferiblemente de 20 a 60 % (v/v), más preferiblemente de 25 a 55 % (v/v) de alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 4 carbonos, preferiblemente solución acuosa de metanol y solución acuosa de etanol, y alcohol butílico saturado con agua.

El disolvente usado para preparar el extracto soluble en disolvente de Rhizoma Coptidis u hoja de hiedra puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en de 10 a 70 % (v/v), preferiblemente de 20 a 60 % (v/v), más preferiblemente de 25 a 55 % (v/v) de alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 6 carbonos, preferiblemente solución acuosa de alcohol propílico y solución acuosa de alcohol isopropílico, y alcohol butílico saturado con agua.

20 El extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra puede ser una mezcla de extracto de Rhizoma Coptidis y extracto de hoja de hiedra, o un extracto de una mezcla de Rhizoma Coptidis y hoja de hiedra. Por ejemplo, el extracto combinado puede ser un extracto crudo obtenido mezclando Rhizoma Coptidis y hoja de hiedra y sometiendo la mezcla a extracción con uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en agua y alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 4 carbonos, o un extracto soluble en disolvente obtenido añadiendo al extracto crudo uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en una solución acuosa de alcohol inferior que tiene 1 a 6 carbonos, preferiblemente solución acuosa de alcohol propílico y solución acuosa de alcohol isopropílico, y alcohol butílico saturado con agua.

25 Preferiblemente, el disolvente usado para preparar el extracto crudo de Rhizoma Coptidis y hoja de hiedra puede ser agua, de 10 a 70 % (v/v), preferiblemente de 20 a 60 % (v/v), más preferiblemente de aproximadamente 25 a 55 % (v/v) de solución acuosa de metanol o solución acuosa de etanol, o alcohol butílico saturado con agua. El disolvente usado para preparar el extracto soluble en disolvente puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en de 10 a 70 % (v/v), preferiblemente de 20 a 60 % (v/v), más preferiblemente de aproximadamente 25 a 55 % (v/v) de una solución acuosa de alcohol inferior que tiene 1 a 6 carbonos, preferiblemente solución acuosa de alcohol propílico y solución acuosa de alcohol isopropílico, y alcohol butílico saturado con agua.

30 La "fracción" puede obtenerse sometiendo el extracto soluble en disolvente a una cromatografía en columna de gel de sílice con un disolvente mezclado de cloruro de metileno y metanol (30:1 a 7:1 (v/v)).

35 El extracto de Rhizoma Coptidis, extracto o fracción soluble en disolvente comprende berberina, palmitina, coptisina, columbamina y jatrorrizina, preferiblemente berberina (0,5 a 47,0 partes en peso):palmitina (0,2 a 21,4 partes en peso):coptisina (0,1 a 18,0 partes en peso):columbamina (0,1 a 3,2 partes en peso):jatrorrizina (0,1 a 2,6 partes en peso).

EEEn la presente memoria también se describe un método de preparación de un extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra que tiene actividades antitusivas, expectorantes, antihistamínicas, de supresión de broncoconstricción, supresión de hipersensibilidad de vías respiratorias, supresión de oclusión bronquial en tejido de pulmón y supresión de infiltración de células inflamatorias.

45 El método comprende la etapa de extracción de Rhizoma Coptidis, preferiblemente la parte de rizoma del mismo con uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en agua y alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 4 carbonos, por ejemplo, agua, de 10 a 70 % (v/v), preferiblemente de 20 a 60 % (v/v), más preferiblemente, de aproximadamente 25 a 55 % (v/v) de solución acuosa de metanol o solución acuosa de etanol, o alcohol butílico saturado con agua.

50 El método de preparación del extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra puede comprender las etapas de:

55 extracción de hoja de hiedra seca con uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en agua y alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 4 carbonos, por ejemplo, agua, de 10 a 70 % (v/v), preferiblemente de 20 a 60 % (v/v), más preferiblemente de 25 a 55 % (v/v) de solución acuosa de metanol o solución acuosa de etanol, o alcohol butílico saturado con agua, para obtener el extracto de hoja de hiedra;

- extracción de Rhizoma Coptidis, preferiblemente la parte de rizoma del mismo con uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 4 carbonos, por ejemplo, agua, de 10 a 70 % (v/v), preferiblemente de 20 a 60 % (v/v), más preferiblemente de 25 a 55 % (v/v) de solución acuosa de metanol, o solución acuosa de etanol, o alcohol butílico saturado con agua, para obtener el extracto de Rhizoma Coptidis; y
- 5 mezcla del extracto de la hoja de hiedra obtenido y el extracto de Rhizoma Coptidis en una relación de 0,1:1 a 10:1 (el peso de extracto de hoja de hiedra:el peso de extracto de Rhizoma Coptidis), preferiblemente de 0,2:1 a 5:1, más preferiblemente de 1:1 a 4:1, mucho más preferiblemente de 1,5:1 a 3,5:1, lo más preferiblemente de 2,5:1 a 3,5:1, basado en el contenido sólido.
- 10 La etapa de preparación de extracto de hoja de hiedra y la etapa de preparación de extracto de Rhizoma Coptidis además puede comprender la etapa de adición de uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 6 carbonos, preferiblemente alcohol butílico saturado con agua, alcohol propílico y alcohol isopropílico al extracto obtenido, para obtener un extracto soluble en disolvente.
- La etapa de preparación del extracto de hoja de hiedra será explicada en detalle: se corta hoja de hiedra y se lava con agua para eliminar impurezas, y la hoja se seca y, a continuación, se somete a extracción a reflujo con uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en agua y alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 4 carbonos, por ejemplo, agua, de 10 a 70 % (v/v), preferiblemente de 20 a 60 % (v/v), más preferiblemente de 25 a 55 % de solución acuosa de metanol o solución acuosa de etanol, o alcohol butílico saturado con agua, en una cantidad de aproximadamente 5 a 20 veces en volumen, preferiblemente 7 a 15 veces en volumen de la hoja de hiedra seca.
- 15 La temperatura de extracción es de 40 a 110 °C, preferiblemente 55 a 90 °C.
- 20 Después de la extracción, el extracto se filtra para recoger el filtrado y el residuo se somete a extracción a reflujo con uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en agua y alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 4 carbonos, por ejemplo, agua, de 10 a 70 % (v/v), preferiblemente de 20 a 60 % (v/v), más preferiblemente de 25 a 55 % de solución acuosa de metanol o solución acuosa de etanol, o alcohol butílico saturado con agua, en una cantidad de aproximadamente 5 a 15 veces en volumen, preferiblemente 8 a 12 veces en volumen. La temperatura de extracción es, aunque no se limita específicamente, de 40 a 110 °C, preferiblemente 55 a 90 °C. Después de la extracción, el extracto se filtra, el filtrado se combina con filtrado previamente obtenido y se concentran bajo vacío para preparar extracto de hoja de hiedra. Las extracciones dobles y la combinación de los filtrados obtenidos después de cada extracción pueden incrementar la eficacia de extracción, pero el número de extracción no se limita al mismo.
- 25 La etapa de preparación de extracto de Rhizoma Coptidis será explicada en detalle: La parte de rizoma del Rhizoma Coptidis se corta en pequeños pedazos y, a continuación, uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 4 carbonos, por ejemplo, agua, de 10 a 70 % (v/v), preferiblemente de 20 a 60 % (v/v), más preferiblemente de 25 a 55 % de solución acuosa de metanol o solución acuosa de etanol, o alcohol butílico saturado con agua, se añade al mismo en una cantidad de aproximadamente 3 a 20 veces en volumen, preferiblemente 5 a 15 veces en volumen de la materia prima para extraer durante 0,5 a 20 horas, preferiblemente 1 a 10 horas, más preferiblemente 2 a 5 horas. La temperatura de extracción es, aunque no se limita específicamente, preferiblemente de 40 a 110 °C, preferiblemente 55 a 90 °C. Preferiblemente, el extracto obtenido se filtra para recoger el filtrado, y uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 4 carbonos, por ejemplo, agua, de 10 a 70 % (v/v), preferiblemente de 20 a 60 % (v/v), más preferiblemente de 25 a 55 % de solución acuosa de metanol o solución acuosa de etanol, o alcohol butílico saturado con agua, se añaden al residuo en una cantidad de aproximadamente 5 a 15 veces en volumen, preferiblemente 8 a 12 veces en volumen, y la temperatura se eleva para volver a extraer durante 1 a 10 horas, preferiblemente 2 a 5 horas y, a continuación, el extracto se filtra y se concentra bajo vacío para obtener extracto de Rhizoma Coptidis. La combinación del extracto obtenido con filtrado previamente obtenido puede incrementar la eficacia de extracción.
- 30 Las extracciones dobles y la combinación de los filtrados obtenidos después de cada extracción pueden incrementar la eficacia de extracción, pero el número de extracción no se limita a las mismas.
- Si la cantidad del disolvente usado para preparar extracto de Rhizoma Coptidis y/o el extracto de hoja de hiedra es demasiado pequeña, la agitación es difícil y la solubilidad del extracto disminuye a eficacia de extracción inferior. Si la cantidad del disolvente usado para preparar extracto de Rhizoma Coptidis y/o extracto de hoja de hiedra es muy grande, la cantidad de alcohol inferior usado para la siguiente etapa de purificación se incrementa para ocasionar problemas económicos y problemas en su manejo. Por tanto, es preferible ajustar la cantidad del disolvente dentro del intervalo descrito anteriormente .
- 35 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la re-extracción se puede realizar después de la extracción primaria, que es para prevenir la disminución en la eficacia de extracción realizando únicamente la extracción primaria, debido a que en el caso de que el extracto herbal sea producido en grandes cantidades, incluso si se realiza la filtración efectiva, la cantidad de extracto herbal es alta, generando de ese modo pérdidas del mismo y, por tanto, disminuye la eficacia de extracción cuando se realiza únicamente la extracción primaria. Por lo tanto, de
- 40
- 45
- 50
- 55

- acuerdo con una realización preferida de la presente invención, se puede realizar la re-extracción después de la extracción primaria. Además, como resultado del examen de la eficacia de extracción en cada etapa, se ha encontrado que el aproximadamente 80 al 90 % de la cantidad de extracto total se extrae por extracción secundaria y, por tanto, se puede sugerir que las extracciones en dos etapas permiten eficacia económica significativa en comparación con las extracciones en múltiples etapas más de una tercera extracción.
- 5 El extracto soluble en disolvente puede prepararse mediante la suspensión del extracto crudo obtenido en aproximadamente 2 a 10 veces, preferiblemente aproximadamente 3 a 7 veces en volumen de agua, y adición al mismo de uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en una solución acuosa de alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 6 carbonos, preferiblemente solución acuosa de alcohol propílico o solución acuosa de alcohol isopropílico, y alcohol butílico saturado con agua en una cantidad de 0,5 a 3 veces, preferiblemente la cantidad equivalente a 2 veces de la suspensión para una a cinco veces, preferiblemente dos a tres veces, para extraer una capa soluble en disolvente y, a continuación, concentración bajo vacío.
- 10 La etapa de extracción soluble en disolvente usando alcohol inferior es para purificar impurezas innecesarias tales como proteínas, polisacáridos, ácidos grasos y similares. Si la cantidad del alcohol inferior usado para lo mismo es pequeña en comparación con el filtrado, se forman partículas finas de ingredientes innecesarios tales como ácido graso, produciendo de ese modo la separación de capas no uniforme y disminuyendo la cantidad de extracción de principios activos. Por lo tanto, puede ser preferible ajustar la cantidad del alcohol inferior dentro del intervalo descrito anteriormente.
- 15 La fracción de alcohol inferior obtenida después de la separación de capas se concentra bajo vacío a 50 a 60 °C para separar el disolvente restante en la muestra.
- 20 Con el fin de controlar el contenido del alcohol inferior restante en el concentrado obtenido para hacerlo adecuado para su uso como materia prima para medicina, el concentrado puede someterse a concentración azeotrópica con aproximadamente 10 a 30 veces, preferiblemente 15 a 25 veces, más preferiblemente aproximadamente 20 veces en peso de agua, basado en la cantidad total del concentrado, durante 1 a 5 veces, preferiblemente 2 a 3 veces, y la cantidad equivalente de agua se añade al mismo para suspenderlo homogéneamente y, a continuación, la suspensión se liofiliza para preparar extracto de *Rhizoma Coptidis* y/o extracto de hoja de hiedra en forma de polvo.
- 25 Preferiblemente, con el fin de combinar homogéneamente cada extracto en el extracto combinado, se añade aproximadamente 2 a 3 veces en peso de agua al extracto combinado y, a continuación, se concentra bajo vacío a 50 a 60 °C, se añade la cantidad equivalente de agua de nuevo al concentrado para suspenderlo homogéneamente y, a continuación, la suspensión se liofiliza para preparar una composición en forma de polvo.
- 30 De acuerdo con otra realización, el método para preparar extracto combinado de *Rhizoma Coptidis* con hoja de hiedra puede comprender las etapas de:
- 35 mezcla de la hoja de hiedra seca y *Rhizoma Coptidis*, preferiblemente la parte de rizoma de la misma en una relación en peso de 1:4 a 7:1 (el peso de hoja de hiedra:el peso de *Rhizoma Coptidis*), preferiblemente de 1:1 a 6:1, más preferiblemente de 2:1 a 5:1 para preparar una mezcla de hoja de hiedra y *Rhizoma Coptidis*; y
- extracción de la mezcla con uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en agua y alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 4 carbonos, por ejemplo, agua, de 10 a 70 % (v/v), preferiblemente de 20 a 60 % (v/v), más preferiblemente de aproximadamente 25 a 55 % (v/v) de solución acuosa de metanol o solución acuosa de etanol, o alcohol butílico saturado con agua.
- 40 El método anterior además puede comprender la etapa de adición de uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en alcohol inferior lineal o ramificado que tiene 1 a 6 carbonos, preferiblemente alcohol propílico, alcohol isopropílico y alcohol butílico saturado con agua, para obtener extracto soluble en disolvente, después de la etapa de obtener extracto de la mezcla de hoja de hiedra y *Rhizoma Coptidis*.
- 45 Los detalles de las etapas de preparación del extracto crudo y el extracto soluble en disolvente son como se describen en la preparación de cada extracto herbal.
- 50 Se puede utilizar cualquier método convencionalmente usado. Por ejemplo, la extracción se puede realizar a través de la extracción a temperatura ambiente, extracción en agua caliente, extracción ultrasónica, extracción por reflujo o extracción por enfriamiento. Otro aspecto, la presente invención proporciona una composición antitusiva que comprende el extracto de *Rhizoma Coptidis*. La composición además puede comprender extracto de hoja de hiedra como principio activo. En otro aspecto, la presente invención también proporciona una composición expectorante que comprende el extracto de *Rhizoma Coptidis*. La composición además puede comprender extracto de hoja de hiedra como principio activo. En aún otro aspecto, la presente invención también proporciona una composición para prevenir y/o tratar enfermedad respiratoria que comprende el extracto de *Rhizoma Coptidis* o un extracto combinado de *Rhizoma Coptidis* con hoja de hiedra como principio activo.
- 55 En la presente memoria también se describe un método de supresión de tos que comprende la etapa de administración del extracto de *Rhizoma Coptidis* o, preferiblemente un extracto combinado de *Rhizoma Coptidis* con

hoja de hiedra a un paciente en una cantidad terapéuticamente efectiva. En la presente invención también se describe un método de eliminación de esputo que comprende la etapa de administración del extracto de Rhizoma Coptidis, o preferiblemente un extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra, a un paciente en una cantidad terapéuticamente efectiva. En aún otro aspecto, en la presente invención se describe un método de

5 prevención y/o tratamiento de enfermedad respiratoria que comprende la etapa de administración del extracto de Rhizoma Coptidis o un extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra a un paciente en una cantidad terapéuticamente efectiva. El paciente puede ser cualquier mamífero que necesita supresión de tos, eliminación de esputo o tratamiento y/o prevención de enfermedad respiratoria, preferiblemente humana.

La cantidad terapéuticamente efectiva es una dosis determinada para obtener el efecto de tratamiento deseado. Se puede variar dependiendo de la distinción de edad, peso, sexo, forma de dosis, estado de salud y gravedad de la enfermedad y también se puede variar dependiendo del juicio del médico o farmacéutico. Por ejemplo, la dosis diaria puede ser de 0,5 a 500 mg/kg, preferiblemente 1 a 300 mg/kg, basado en el contenido de principio activo, pero no limitado a lo mismo. La dosis se puede administrar una vez al día o varias veces al día. La dosis se ilustra para caso promedio, y puede ser superior o inferior individualmente. Si la dosis diaria de la composición que comprende el

10 extracto combinado de la presente invención es menor que el intervalo anteriormente descrito, no se puede obtener efecto significativo; y si supera el intervalo anteriormente descrito, disminuye la eficiencia económica y la dosis está fuera de la dosis común ocasionando así efectos secundarios indeseables. Por tanto, la dosis diaria preferiblemente está en el intervalo anteriormente descrito.

El extracto de Rhizoma Coptidis y un extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra muestran actividades antitusivas, expectorantes, antihistamínicas, de supresión de broncoconstricción, supresión de hipersensibilidad de vías respiratorias, supresión de oclusión bronquial en tejido de pulmón y supresión de infiltración de células inflamatorias y, por tanto, se pueden usar para tratar, prevenir o aliviar enfermedades respiratorias relacionadas. Y, el extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra es preferible debido a que la sinergia se puede obtener en comparación con cada extracto solo.

20

La enfermedad respiratoria puede ser toda enfermedad que implica tos y esputo y, por ejemplo, se selecciona del grupo que consiste en tos o esputo común; enfisema pulmonar que implica tos o esputo; bronquitis tal como bronquitis crónica, bronquitis aguda, bronquitis catarral, enfermedad bronquial obstructiva o inflamatoria, etc.; asma tal como asma bronquial, asma atópica, asma mediada por IgE bronquial atópica, asma no atópica, asma alérgica, asma no alérgica, etc.; broncoconstricción crónica o aguda; síndrome infantil estriduloso; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; adenoma bronquial; nódulo pulmonar solitario; tuberculosis pulmonar; piotórax; absceso pulmonar; resfriado común; gripe; e histiocitosis pulmonar.

25 30

La composición de la presente invención puede administrarse a mamíferos incluidos seres humanos en diversas vías. Puede administrarse usando el método comúnmente usado, por ejemplo, puede administrarse oralmente, intrarectalmente, o por inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, intrauterina o intracerebroventricular. La composición de la presente invención se puede formular en una forma de dosis oral tal como polvo, gránulo, comprimido, cápsula, suspensión, emulsión, jarabe, aerosol, etc., o una forma de dosis parenteral tal como agente transdérmico, supositorio y solución de inyección estéril.

35

La composición de la presente invención además puede comprender adyuvante farmacéuticamente adecuado y fisiológicamente aceptable tal como vehículo, excipiente y diluyentes.

La composición de la presente invención se puede administrar sola; sin embargo, en general, considerando la vía de administración y la práctica farmacéutica estándar, puede administrarse con un vehículo farmacéutico seleccionado. Por ejemplo, la composición se puede administrar oralmente, intrabucalmente o sublingualmente en forma de comprimido que contiene lactosa o almidón, cápsula sola o que contiene excipiente, elixir que contiene compuestos químicos aromatizantes o colorantes, o suspensión. La formulación líquida puede formularse con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agente de suspensión (por ejemplo, metilcelulosa, glicérido semisintético tal como Witepsol, o una mezcla de glicéridos tal como una mezcla de aceite de semilla de albaricoque y éster de PEG-6, o una mezcla de PEG-8 y glicérico caprílico/cáprico).

40 45

En otro aspecto, la presente invención proporciona un alimento funcional saludable para suprimir la tos, eliminar el esputo, o prevenir o mejorar la enfermedad respiratoria tal como asma, que comprende el extracto de Rhizoma Coptidis o un extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra. El alimento funcional saludable puede ser comida, bebida, o aditivos alimenticios, etc.

50

El contenido del extracto como principio activo contenido en el alimento funcional saludable se puede variar apropiadamente dependiendo de la forma de comida, uso deseado, etc., sin limitaciones específicas. Por ejemplo, se puede añadir en una cantidad de 0,01 a 15 % en peso de la comida total y para composición de bebida saludable, puede añadirse en una cantidad de 0,02 a 10 g, preferiblemente de 0,3 a 1 g, basado en 100 ml de la composición.

55

En caso de que la composición herbal de la presente invención se administre en el cuerpo humano, considerando las propiedades generales de los extractos naturales, se cree que no existe preocupación de efectos secundarios en

comparación con otras medicinas sintéticas y, como resultado de la prueba de toxicidad práctica, se prueba que no tiene influencia sobre un cuerpo vivo.

Breve Descripción de los Dibujos

5 La Figura 1 muestra actividades expectorantes del extracto de Rhizoma Coptidis y la fracción activa e ingredientes representativos del mismo a través del método de secreción de rojo de fenol en un modelo de ratón.

La Figura 2 muestra actividades expectorantes de los extractos preparados en el Ejemplo 2, indicando los resultados medidos por el método de rojo de fenol usando un ratón.

La Figura 3 muestra actividades antitusivas de los extractos preparados en el Ejemplo 2, indicando los resultados de la prueba de supresión de tos usando un conejillo de indias.

10 La Figura 4 muestra actividades de supresión de broncoconstricción de los extractos preparados en el Ejemplo 2, indicando la relajación (%) para un inductor de contracción usando un bronquio extraído de un conejillo de indias.

La Figura 5 muestra los efectos de los extractos de los Ejemplos 2~7 en oclusión bronquial en tejido de pulmón y actividades de supresión de infiltración de células inflamatorias en un tejido pulmonar de ratón sensibilizado con OVA y ensayado ((a) grupo normal, (b) grupo inducido, (c) control positivo, (d) ejemplos 2~7).

15 Ejemplos

La presente invención será explicada en detalle con referencia a los siguientes ejemplos y experimentos.

Ejemplo 1. Preparación del extracto de Rhizoma Coptidis

1-1. Preparación del extracto de Rhizoma Coptidis usando el uso de agua

1-1-1. Preparación de extracto crudo de Rhizoma Coptidis (CR-GA)

20 El Rhizoma Coptidis comprado en el mercado de Kyungdong se lavó con agua para eliminar impurezas y 250 g de Rhizoma Coptidis seco se sometieron a extracción con agua caliente con 1,5 l de agua a 80 °C dos veces durante cada 3 horas y, a continuación, el extracto se filtró y se concentró bajo vacío para obtener 62,5 g de extracto crudo (rendimiento del 25 % comparado con la hierba sin procesar), que se nombró como "CR-GA" y se usó en el siguiente Ejemplo 1-2.

25 1-1-2. Preparación de extracto soluble en disolventes de Rhizoma Coptidis (CR-GA-1)

30 A 62,5 g del CR-GA obtenido en el Ejemplo 1-1-1, se añadieron 0,5 l de agua para suspenderlo, y se añadió al mismo 1 l de alcohol butílico saturado con agua, para separar una capa dos veces y, a continuación, solo se recogió la fracción de alcohol butílico saturada con agua y se concentró bajo vacío hasta que se secó. Cuando se evaporó la mayoría del alcohol butílico y el agua, se añadieron 0,4 l de agua para concentrarlo azeotrópicamente, lo cual se repitió dos veces. Y, finalmente, se añadieron 0,1 l de agua destilada para suspender el concentrado y, a continuación, la suspensión se liofilizó para obtener 19,8 g de extracto de Rhizoma Coptidis en forma de polvo (7,92 % de rendimiento comparado con la hierba sin procesar), que se nombró como "CR-GA-1" y se usó como una muestra en los siguientes Experimentos.

1-2. Preparación del extracto de Rhizoma Coptidis usando etanol al 50 % (v/v)

35 1-2-1. Preparación de extracto crudo de Rhizoma Coptidis (CR-GB)

40 El Rhizoma Coptidis comprado en el mercado de Kyungdong se lavó con agua para eliminar impurezas y, 250 g de Rhizoma Coptidis seco se sometió a extracción a reflujo con 2,0 l de solución acuosa de etanol al 50 % (v/v) a 80 °C dos veces durante cada 3 horas y, a continuación, el extracto se filtró y se concentró bajo vacío para obtener 57,5 g de extracto crudo (rendimiento del 23 % comparado con la hierba sin procesar), que se nombró como "CR-GB" y se usó en el siguiente Ejemplo 2-2.

1-2-2. Preparación de extracto de Rhizoma Coptidis soluble en disolvente (CR-GB-1)

45 A 57,5 g del CR-GB obtenido en el Ejemplo 1-2-1, se añadieron 0,3 l de agua para suspenderlo, y se añadieron a la misma 0,6 l de alcohol butílico saturado con agua, para separar una capa dos veces y, a continuación, únicamente se recogió la fracción de alcohol butílico y se concentró bajo vacío hasta que se secó. Cuando se evaporó la mayoría del alcohol butílico y el agua, se añadieron 0,2 l de agua para concentrarlo azeotrópicamente, lo cual se repitió dos veces. Y, finalmente, se añadieron 0,2 l de agua destilada se agregó para suspender el concentrado y, a continuación, la suspensión se liofilizó para obtener 31,8 g de extracto de Rhizoma Coptidis en forma de polvo (rendimiento del 12,7 % comparado con la hierba sin procesar), que se nombró como "CR-GB-1" y se usó como una muestra en los siguientes Experimentos.

50 1-3. Preparación del extracto de Rhizoma Coptidis usando alcohol butílico saturado con agua

1-3-1. Preparación del extracto de Rhizoma Coptidis (CR-GC)

El Rhizoma Coptidis comprado en el mercado de Kyungdong se lavó con agua para eliminar impurezas y, 250 g de Rhizoma Coptidis seco se sometieron a extracción a reflujo con 2,5 l de alcohol n-butílico saturado con agua a 85 °C dos veces durante cada 3 horas y, a continuación, el extracto se filtró y se concentró bajo vacío. Cuando se evaporó la mayoría del alcohol butílico, se añadieron 0,2 l de agua para concentrarlo azeotrópicamente, lo cual se repitió dos veces. Finalmente, se añadieron 0,2 l de agua destilada para suspenderlo, y la suspensión se liofilizó para obtener 32,8 g de extracto en forma de polvo (13,1 % de rendimiento comparado con la hierba sin procesar), que se nombró como "CR-GC" y se usó en los siguientes Experimentos.

1-4. Separación de extracto de Rhizoma Coptidis

20 g del CR-GB-1 obtenido en el Ejemplo 1-2-2 se dividieron en 5 fracciones por cromatografía en columna de gel de sílice usando un disolvente mezclado de cloruro de metileno y metanol (30:1 ~ 7:1 (v/v)). Fr. 1 fue de 0,8 g (de aquí en adelante, referida como "Fr. 1"), Fr. 2 fue de 2,6 g (de aquí en adelante, referida como "Fr. 2"), Fr. 3 fue de 5,5 g (de aquí en adelante, referida como "Fr. 3"), Fr. 4 fue de 2,8 g (de aquí en adelante, referida como "Fr. 4"), Fr. 5 fue de 6,5 g (de aquí en adelante, referida como "Fr. 5"), las cuales se usaron como muestras en los siguientes Experimentos.

Ejemplo 2. Preparación de extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra

Preparación de extracto de hoja de hiedra

Se lavaron con agua hojas de hiedra (*Hedera helix*) para eliminar impurezas y se secaron completamente. A 250 g de las hojas de hiedra preparadas, se añadieron 3 l de solución acuosa de etanol al 30 % (v/v) y se sometieron a extracción a reflujo durante 6 horas y, a continuación, el extracto se filtró para recoger el filtrado. Al residuo, se añadieron 2,5 l de solución acuosa de etanol al 30 % (v/v), se sometió a extracción a reflujo a 80 °C durante 3 horas y el filtrado obtenido se combinó con filtrado previamente recogido y se concentró a vacío. Cuando la mayoría del disolvente se evaporó, se añadieron 0,2 l de agua para concentrarlo azeotrópicamente, lo cual se repitió dos veces. Y, se añadió la cantidad equivalente de agua para suspenderla homogéneamente y, a continuación, se liofilizó la suspensión para obtener 42,4 g de extracto de hoja de hiedra en forma de polvo. El extracto de hoja de hiedra obtenido se usó para la preparación del extracto combinado en los siguientes Ejemplos 2-1 a 2-11.

Preparación del extracto de Rhizoma Coptidis

Se lavó Rhizoma Coptidis con agua para eliminar impurezas y se secó completamente. A 250 g del Rhizoma Coptidis preparado, se añadieron 2,0 l de solución acuosa de etanol al 50 % (v/v) para someter a extracción a reflujo a 80 °C durante 3 horas. Y, a continuación, el extracto se filtró y se concentró bajo vacío para obtener 57,5 g del extracto crudo. Y se añadieron al mismo 0,3 l de agua para suspenderlo y se añadieron al mismo 0,6 l de alcohol butílico saturado con agua para separar una capa dos veces. Y, a continuación, únicamente se recogió la fracción de alcohol butílico y se concentró bajo vacío hasta que se secó. Cuando se evaporaron la mayoría del alcohol butílico y el agua, se añadió 0,2 l de agua para concentrarlo azeotrópicamente, lo cual se repitió dos veces. Finalmente, se añadió al mismo una cantidad equivalente de agua para suspenderlo y la suspensión se liofilizó para obtener 31,8 g de Rhizoma Coptidis que se usó para la preparación del extracto combinado en los siguientes Ejemplos 2-1 a 2-11.

2-1. Preparación de extracto combinado (0,2:1)

El extracto de hoja de hiedra anteriormente preparado y el extracto de Rhizoma Coptidis se mezclaron en una relación en peso de 0,2:1 (el peso del extracto de hoja de hiedra:el peso del extracto de Rhizoma Coptidis). Con el fin de mezclar homogéneamente, aproximadamente 2 a 3 veces en peso de agua se añadieron al extracto combinado y, a continuación, se concentraron bajo vacío a una temperatura de 50 a 60 °C. Y, se añadió de nuevo una cantidad equivalente de agua al concentrado obtenido para suspenderlo homogéneamente, y la suspensión se liofilizó para preparar un extracto combinado en forma de polvo.

2-2. Preparación de extracto combinado (0,4:1)

Se preparó un extracto combinado mediante el mismo método que el anterior Ejemplo de Preparación 1, excepto que la relación del extracto de hoja de hiedra preparado y el extracto de Rhizoma Coptidis se cambió a 0,4:1 (el peso de extracto de hoja de hiedra:el peso de Rhizoma Coptidis).

2-3. Preparación de extracto combinado (1:1)

Se preparó un extracto combinado mediante el mismo método que el anterior Ejemplo de Preparación 1, excepto que la relación del extracto de hoja de hiedra preparado y el extracto de Rhizoma Coptidis se cambió a 1:1 (el peso de extracto de hoja de hiedra:el peso de Rhizoma Coptidis).

2-4. Preparación de extracto combinado (1,5:1)

Se preparó un extracto combinado mediante el mismo método que el anterior Ejemplo de Preparación 1, excepto que la relación del extracto de hoja de hiedra preparado y el extracto de Rhizoma Coptidis se cambió a 1,5:1 (el peso de extracto de hoja de hiedra:el peso de Rhizoma Coptidis).

2-5. Preparación de extracto combinado (2:1)

- 5 Se preparó un extracto combinado mediante el mismo método que el anterior Ejemplo de Preparación 1, excepto que la relación del extracto de hoja de hiedra preparado y el extracto de Rhizoma Coptidis se cambió a 2:1 (el peso de extracto de hoja de hiedra:el peso de Rhizoma Coptidis).

2-6. Preparación de extracto combinado (2,5:1)

- 10 Se preparó un extracto combinado mediante el mismo método que el anterior Ejemplo de Preparación 1, excepto que la relación del extracto de hoja de hiedra preparado y el extracto de Rhizoma Coptidis se cambió a 2,5:1 (el peso de extracto de hoja de hiedra:el peso de Rhizoma Coptidis).

2-7. Preparación de extracto combinado (3:1)

- 15 Se preparó un extracto combinado mediante el mismo método que el anterior Ejemplo de Preparación 1, excepto que la relación del extracto de hoja de hiedra preparado y el extracto de Rhizoma Coptidis se cambió a 3:1 (el peso de extracto de hoja de hiedra:el peso de Rhizoma Coptidis).

2-8. Preparación de extracto combinado (3,5:1)

Se preparó un extracto combinado mediante el mismo método que el anterior Ejemplo de Preparación 1, excepto que la relación del extracto de hoja de hiedra preparado y el extracto de Rhizoma Coptidis se cambió a 3,5:1 (el peso de extracto de hoja de hiedra:el peso de Rhizoma Coptidis).

- 20 2-9. Preparación de extracto combinado (4:1)

Se preparó un extracto combinado mediante el mismo método que el anterior Ejemplo de Preparación 1, excepto que la relación del extracto de hoja de hiedra preparado y el extracto de Rhizoma Coptidis se cambió a 4:1 (el peso de extracto de hoja de hiedra:el peso de Rhizoma Coptidis).

2-10. Preparación de extracto combinado (4,5:1)

- 25 Se preparó un extracto combinado mediante el mismo método que el anterior Ejemplo de Preparación 1, excepto que la relación del extracto de hoja de hiedra preparado y el extracto de Rhizoma Coptidis se cambió a 4,5:1 (el peso de extracto de hoja de hiedra:el peso de Rhizoma Coptidis).

2-11. Preparación de extracto combinado (5:1)

- 30 Se preparó un extracto combinado mediante el mismo método que el anterior Ejemplo de Preparación 1, excepto que la relación del extracto de hoja de hiedra preparado y el extracto de Rhizoma Coptidis se cambió a 5:1 (el peso de extracto de hoja de hiedra:el peso de Rhizoma Coptidis).

Ejemplo 3. Experimento para la actividad del extracto de Rhizoma Coptidis

3-1. Medición de la actividad expectorante del extracto de Rhizoma Coptidis

Método del experimento

- 35 Con el fin de medir las actividades expectorantes de los extractos de Rhizoma Coptidis de los Ejemplos 1-1 a 1-3, el experimento se llevó a cabo usando el método de Engler et al. (Engler H., Szelenyl I., *J. Pharmacol. Moth.* 11, 151-157, 1984; Bao-quin Lin et., *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 21, 259-263, 2008) en el siguiente procedimiento.

- 40 Un fármaco de control positivo (Ambroxol, Sigma) y los fármacos de ensayo (extracto de Rhizoma Coptidis de los Ejemplos 1-1 a 1-3) se administraron oralmente a un ratón macho (8 semanas de edad, Sam tako BioKorrea) y después de 30 minutos, se inyectaron intraperitonealmente 500 mg/kg de rojo de fenol (el rojo de fenol se disolvió en solución salina). Después de 30 minutos, el ratón fue anestesiado con éter dietílico, exanguinado al cortar la aorta abdominal y, a continuación, se extirpó la tráquea completa. La tráquea separada se colocó en 1 ml de solución salina y se lavó durante 30 minutos, se centrifugó a 10.000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos, se añadió hidróxido de sodio 1 N (NaOH) al sobrenadante (añadiendo 0,1 ml de NaOH 1 N por 1 ml de sobrenadante)
- 45 y, a continuación, se midió la absorbancia a 546 nm para medir la actividad expectorante como concentración del rojo de fenol.

Resultados del Experimento

Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente Tabla 1

Tabla 1

		Dosis (mg/kg)	Capacidad de secretar esputo (%)
Ejemplo 1-1	CR-GA	500	29
	CR-GA-1	500	36
Ejemplo 1-2	CR-GB	500	32
	CR-GB-1	500	41
Ejemplo 1-3	CR-GC	500	38
Control positivo (Ambroxol)		250	32

Como resultados del experimento, mostrados en la anterior Tabla 1, los extractos tuvieron excelentes actividades en conjunto, particularmente CR-GB-1 del Ejemplo 2 mostró la actividad de secreción de esputo más excelente.

- 5 Y, se midieron las actividades de CR-GC-1 del Ejemplo 2 de acuerdo con la dosis (50, 100, 150, 200, 500 mg/kg), cuyos resultados se presentan en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2

		Dosis (mg/kg)	Capacidad de secretar esputo (%)
Ejemplo 1-2	CR-GB-1	50	4
		100	22
		150	32
		200	33
		500	41
Control positivo (Ambroxol)		250	30

- 10 Como resultados del experimento, mostrados en la anterior la Tabla 2, CR-GB-1 del Ejemplo 1-2 mostró la actividad de secreción de esputo más excelente a una dosis de 500 mg/kg.

3-2. Medición de la actividad antitusiva del extracto de Rhizoma Coptidis

Método del Experimento

- 15 Con el fin de medir la actividad antitusiva de los extractos de Rhizoma Coptidis de los Ejemplos 1-1 a 1-3, el experimento se llevó a cabo usando el método de Tanaka et al. (Motomu Tanaka y Kei Maruyama, *J. Pharmacol. Sci.* 93, 465-470, 2003, Daoui, Cognon, Naline et., *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 158, 42-48, 1998) en el siguiente procedimiento.

- 20 Un fármaco de ensayo se administró oralmente a un conejillo de indias macho (6 semanas de edad, Sam tako BioKorea) y después de 1 hora, el conejillo de indias se colocó en una cámara de pletismógrafo (Buxco, EE.UU.) y, a continuación, se nebulizó un inductor de tos, ácido cítrico (Sigma), para inducir la tos. Como control positivo, se usó la teobromina (Sigma) la cual se usa como antitusivo. Y, el conejillo de indias se expuso a ácido cítrico 0,2 M durante 10 minutos, y se midió el número de toses ocurridas durante 15 minutos.

Resultado del Experimento

Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3

		Dosis (mg/kg)	Capacidad de secretar esputo (%)
Ejemplo 1-1	CR-GA	200	33
	CR-GA-1	200	46
Ejemplo 1-2	CR-GB	200	35
	CR-GB-1	200	52
Ejemplo 1-3	CR-GC	200	44
Control positivo (Teobromina)		50	57

- 25 Como resultados de los experimentos, mostrados en la anterior Tabla 3, los extractos tuvieron excelentes actividades en conjunto y, particularmente, CT-GB-1 del Ejemplo 1-2 mostró la actividad de secreción de esputo más excelente.

- 30 Y, se midieron las actividades de CR-GB-1 del Ejemplo 1-2 de acuerdo con la dosis (50, 100, 150, 200 mg/kg), cuyos resultados se presentan en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4

		Dosis (mg/kg)	Capacidad de suprimir la tos (%)
Ejemplo 1-2	CR-GB-1	50	7
		100	25
		150	37
		200	52
Control positivo (Teobromina)		50	57

Como resultados del experimento, mostrados en la anterior Tabla 4, CR-GB-1 del Ejemplo 1-2 mostró la actividad de supresión de la tos más excelente a una dosis de 200 mg/kg.

3-3. Medición de la actividad antihistamínica del extracto de Rhizoma Coptidis

5 Método del Experimento

Con el fin de medir la actividad antihistamínica del extracto de Rhizoma Coptidis de los Ejemplos 1-1 a 1-3, el experimento se llevó a cabo usando el método de Honuchi et al. (Masako Honuchi y Yoshiyuki Seyama, *J. Health Sci.*, 52(6), 711-717, 2006, Naoki Inagaki et al., *Biol. Pharm. Bull.* 24(7), 829-834, 2001) en el siguiente procedimiento.

- 10 Se midió el efecto antihistamínico usando mastocitos peritoneales de una rata macho (7 semanas de edad, Sam tako BioKorea) sensibilizados con ovalbúmina. Como control positivo, se usó Ketotifeno (Sigma). A una rata sensibilizada con ovalbúmina, se administró oralmente Ketotifeno a una concentración de 5 mg/kg, y los fármacos de ensayo se administraron oralmente respectivamente a una concentración de 200 mg/kg durante 4 días y, a continuación, se separaron los mastocitos peritoneales. Los mastocitos peritoneales (2×10^5 células/ml) se trataron con Ketotifeno a concentraciones de 0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml y 1,0 mg/ml, y los fármacos de ensayo a concentraciones de 0,1 mg/ml, 1,0 mg/ml y 10 mg/ml. Finalmente, los mastocitos se trataron con el compuesto 48/80 (Sigma) que activa la liberación de histamina no inmunológica a una concentración de 10 µg/ml. En este momento, la cantidad de histamina liberada de los mastocitos se cuantificó para examinar si los materiales de ensayo suprimen la liberación de histamina de los mastocitos. Se midió la cantidad relativa de histamina liberada de mastocito en una
- 15
- 20 rata a la cual no se administró fármaco, cuyos resultados se presentan en la siguiente Tabla 5.

Tabla 5

		Dosis oral (mg/kg)	Concentración de tratamiento de mastocito (mg/ml)	Cantidad de liberación de histamina (%)
Ejemplo 1-1	CR-GA	200	0	41
			0,1	38
			1,0	33
			10,0	26
	CR-GA-1	200	0	44
			0,1	35
			1,0	29
			10,0	23
Ejemplo 1-2	CR-GB	200	0	42
			0,1	38
			1,0	31
			10,0	27
	CR-GB-1	200	0	39
			0,1	34
			1,0	27
			10,0	21
Ejemplo 1-3	CR-GC	200	0	41
			0,1	37
			1,0	30
			10,0	22
Control Positivo (Ketotifeno)		5	0	43
			0,01	41
			0,1	32
			1,0	18

Como resultados de los experimentos, mostrados en la anterior Tabla 5, los extractos en conjunto tuvieron excelentes actividades y, particularmente, CR-GB-1 del Ejemplo 1-2 mostró la actividad antihistamínica más excelente.

Y, las actividades de CR-GB-1 del Ejemplo 1-2 se midieron de acuerdo con la dosis (100, 200, 400 mg/kg), cuyos resultados se presentan en la siguiente Tabla 6.

Tabla 6

		Dosis oral (mg/kg)	Concentración de tratamiento de mastocitos (mg/ml)	Cantidad de liberación de histamina (%)
Ejemplo 1-2	CR-GB-1	100	0	49
			0,1	40
			1,0	36
			10,0	30
		200	0	42
			0,1	34
			1,0	27
			10,0	21
		400	0	31
			0,1	26
			1,0	23
			10,0	18
Control Positivo (Ketotifeno)		5	0	43
			0,01	41
			0,1	32
			1,0	18

- 5 Como resultados de los experimentos, mostrados en la anterior Tabla 6, CR-GB-1 del Ejemplo 1-2 mostró la actividad antihistamínica más excelente a una dosis de 400 mg/kg.

3-4. Medición de las actividades antitusivas de subfracciones activas

Con el fin de medir las actividades antitusivas de 5 sub-fracciones preparadas en el anterior Ejemplo 1-4, se llevó a cabo el experimento para actividad antitusiva mediante el mismo método que el Experimento 3-2, cuyos resultados se presentan en la siguiente Tabla 7.

10

Tabla 7

		Dosis (mg/kg)	Capacidad para suprimir la tos (%)
Fr. 1		60	41
Fr. 2		60	32
Fr. 3		60	62
Fr. 4		60	34
Fr. 5		60	24
Control Positivo	Teobromina	50	57

Como resultados del experimento, mostrados en la Tabla 7, las fracciones tuvieron excelentes actividades en conjunto y, particularmente, Fr. 3 mostró la actividad antitusiva más excelente.

- 15 3-5. Medición de actividades antihistamínicas de sub-fracciones activas

Con el fin de medir las actividades antihistamínicas de las 5 sub-fracciones preparadas en el anterior Ejemplo 1-4, se llevó a cabo el mismo experimento que el anterior Experimento 3-3 cuyos resultados se presentan en la siguiente Tabla 8.

Tabla 8

20

	Dosis oral (mg/kg)	Concentración de tratamiento de mastocito (mg/ml)	Cantidad de liberación de histamina (%)
Fr. 1	60	0	55
		0,1	50
		1,0	42
		10,0	39

	Dosis oral (mg/kg)	Concentración de tratamiento de mastocito (mg/ml)	Cantidad de liberación de histamina (%)
Fr. 2	60	0	59
		0,1	54
		1,0	48
		10,0	41
Fr. 3	60	0	38
		0,1	31
		1,0	26
		10,0	19
Fr. 4	60	0	56
		0,1	50
		1,0	44
		10,0	40
Fr. 5	60	0	66
		0,1	62
		1,0	55
		10,0	51
Control Positivo T (Ketotifeno)	5	0	43
		0,01	41
		0,1	32
		1,0	18

Como resultados del experimento, mostrados en la anterior Tabla 8, las fracciones tuvieron excelentes actividades en conjunto y, particularmente, Fr. 3 mostró la actividad antihistamínica más excelente.

3-6. Análisis de compuestos de extracto de Rhizoma Coptidis

- 5 Con el fin de analizar los compuestos de los extractos de Rhizoma Coptidis y las fracciones de los mismos de los anteriores Ejemplos, se llevaron a cabo experimentos usando análisis fisicoquímicos tales como HPLC, LC/MS, Espectrómetro de UV y FT-NMR.

Como resultados, se identificó que berberina, palmatina, coptisina, columbamina y jatrorrizina están contenidas en el extracto de Rhizoma Coptidis. Se analizaron los contenidos de compuestos de los extractos de Coptidis de los Ejemplos 1-1 a 1-4, cuyos resultados se presentan en la siguiente Tabla 9.

- 10

La cromatografía líquida de alta resolución se midió usando el modelo Alliance 2695 de Waters usando PDA 2996 de Waters. Como columna, se usó Hydrosphere C18 de YMC, S-5 μm , 120 mm, 4,6x250 mm D.I., y la temperatura de la muestra se mantuvo a $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ y la temperatura de la columna se mantuvo a $30\text{ }^\circ\text{C} \pm 1$. Una concentración de la muestra fue de 1 mg/ml, la cantidad de inyección fue de 10 μl y el caudal fue de 1,0 ml/min. Como materiales patrón, para berberina, palmatina y coptisina, se compraron los comercializados por Sigma Company y se usaron y, para columbamina y jatrorrizina, se usaron los purificados de Rhizoma Coptidis. La fase móvil fue el estado de gradiente de solución de ácido fosfórico al 0,2 % (disolvente A) y metanol (disolvente B) de 0~60 minutos (A:B=9:1 ~ 6:4), 60~70 minutos (A:B =6:4 ~ 5:5), 70~90 minutos (A:A=5:5 ~ 0:10). Los contenidos de los compuestos en los extractos se indican por la proporción de área para cada material patrón en porcentaje en peso.

- 15

20 **Tabla 9**

		Contenidos de compuestos (%)				
		Berberina	palmatina	coptisina	columbamina	jatrorrizina
Ejemplo 1-1	CR-GA	15,6	4,2	4,3	0,6	0,6
	CR-GA-1	25,3	4,5	4,7	0,6	0,5
Ejemplo 1-2	CR-GB	22,8	5,6	6,5	1,5	0,9
	CR-GB-1	27,0	7,1	5,2	0,9	0,8
Ejemplo 1-3	CR-GC	30,9	7,8	6,2	1,1	1,0
Ejemplo 1-4	Fr. 1	0,5	0,2	0,1	0,1	0,1
	Fr. 2	10,1	6,7	0,8	0,1	0,1
	Fr. 3	47,0	21,4	3,7	3,2	1,5
	Fr. 4	5,2	1,4	18,0	0,1	2,6
	Fr. 5	0,1 o menos	0,1 o menos	0,1 o menos	0,1 o menos	0,1 o menos

Como se muestra en la anterior Tabla 9, como resultados de la comparación de los contenidos de los compuestos principales de acuerdo con los extractos y fracciones, se identificó que estaban contenidas 0,5 a 47,0 partes en peso

de berberina, 0,2 a 21,4 partes en peso de palmatina, 0,1 a 18,0 partes en peso de coptisina, 0,1 a 3,2 partes en peso de columbamina y 0,1 a 2,6 partes en peso de jatrorrizina.

3-7. Medición de la actividad expectorante de berberina

5 Con el fin de medir las actividades expectorantes de los extractos de Rhizoma Coptidis de los Ejemplos 1-2 y 1-3 y las 5 subfracciones preparadas en el Ejemplo 1-4, se llevó a cabo el mismo experimento para la actividad expectorante que el anterior Experimento 1, cuyos resultados se presentan en la siguiente Tabla 10, y se muestra una gráfica de barras para las actividades en la Figura 1.

Tabla 10

	dosis (mg/kg)	Capacidad para secretar esputo (%)	
Fr. 1	125	25	
Fr. 2	125	22	
Fr. 3	125	44	
Fr. 4	125	24	
Fr. 5	125	10	
CR-GB Ejemplo 1-2	125	32	
CR-GB-1 del Ejemplo 1-2	125	38	
CR-GC del Ejemplo 1-3	125	37	
Berberina	125	39	
Control Positivo	Ambroxol	250	34

10 **Ejemplo 4: Ensayo de actividad del extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra**

4-1. Medición de la actividad expectorante

15 Con el fin de evaluar las actividades expectorantes del extracto combinado y el extracto sencillo preparado en el Ejemplo 2 (2-1 a 2-11), el experimento se llevó a cabo mediante el mismo método descrito en el "Método del Experimento" del Experimento 3-1, usando el método de Engler, et al., (Enler H., Szeleny I., *J Pharmacol. Moth.* 11, 151-157, 1984, Bao-quin Lin et., *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 21, 259-263, 2008), cuyos resultados se muestran en la Figura 2. En la Figura 2, para el control positivo, el Ambroxol se administró oralmente a una dosis de 250 mg/kg y el resto de fármacos de ensayo se administraron oralmente a una dosis de 500 mg/kg. Y, para el extracto del Ejemplo 2-7 que muestra la actividad más excelente, las actividades expectorantes se midieron de acuerdo con la dosis, cuyos resultados se presentan en la siguiente Tabla 11.

20 **Tabla 11**

	dosis (mg/kg)	Capacidad de secretar esputo (%)	
Ejemplo 2-7	50	17	
	100	30	
	150	38	
	200	44	
	500	56	
Control Positivo	Ambroxol	250	34

25 Como se muestra en la Figura 2, todos los extractos combinados de los Ejemplos 2-1 a 2-11 presentaron efectos expectorantes mejorados comparados con el extracto de hoja de hiedra, del cual se puede identificar que la sinergia para la actividad farmacológica ocurre por combinación de extracto de Rhizoma Coptidis y extracto de hoja de hiedra.

Particularmente, los Ejemplos 2-3 a 2-9 presentaron efectos expectorantes más excelentes que el expectorante existente Ambroxol, de lo cual se muestra que si el extracto de hoja de hiedra y el extracto de Rhizoma Coptidis se combinan en una relación en peso de 1:1 a 4:1, se pueden obtener efectos expectorantes incrementados.

30 La anterior Tabla 11 muestra los resultados de evaluaciones para las actividades del Ejemplo 2-7 que tiene la mayor actividad de acuerdo con la dosis, y se identifica que el material del Ejemplo 2-7 tiene capacidad más excelente para secretar esputo que el fármaco de control positivo. Particularmente, el material del Ejemplo 2-7 presenta efecto similar al control positivo a una dosis de 100 mg/kg o más, y efecto más excelente que el control positivo a una dosis de 150 mg/kg o más.

4-2. Medición de la actividad antitusiva

Con el fin de medir las actividades antitusivas del extracto de hoja de hiedra y el extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra (Ejemplos 2-1 a 2-11) preparado en el Ejemplo 2, se llevó a cabo el experimento mediante el mismo método descrito en el "Método del Experimento" en el Experimento 3-2 usando el método de Tanaka et al. (Motomu Tanaka y Kei Maruyama, *J. Pharmacol. Sci.* 93, 465~470, 2003, Daoui, Cognon, Naline et. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 158, 42~48, 1998), cuyos resultados se muestran en la Figura 3.

En la Figura 3, para el control positivo, Teobromina, se administró oralmente a una concentración de 50 mg/kg y el resto de los fármacos de ensayo se administraron oralmente a una concentración de 200 mg/kg. Y, para el Ejemplo 2-7 que muestra la actividad más excelente, se evaluaron las actividades antitusivas de acuerdo con la dosis, cuyos resultados se presentan en la siguiente Tabla 12.

10 **Tabla 12**

		dosis (mg/kg)	Capacidad para suprimir la tos (%)
Ejemplo 2-7		50	29
		100	51
		150	69
		200	83
Control positivo	Teobromina	50	56

Como se muestra en la Figura 3, todos los extractos combinados de los Ejemplos 2-1 a 2-11 presentaron efectos antitusivos incrementados que el extracto de hoja de hiedra solo, de lo cual se identifica que ocurre una sinergia para la actividad farmacológica por la combinación del extracto de Rhizoma Coptidis con extracto de hoja de hiedra. Particularmente, los Ejemplos 2-3 a 2-9 presentaron efectos antitusivos más excelentes que el antitusivo existente Teobromina, de lo cual se muestra que si se combinan el extracto de hoja de hiedra y el extracto de Rhizoma Coptidis en una relación en peso de 1:1 a 4:1, se pueden obtener efectos antitusivos más excelentes.

Y, la anterior Tabla 12 muestra los resultados de evaluación para actividades del Ejemplo 2-7 que tiene la mayor actividad de acuerdo con la dosis, de lo cual se muestra que el material del Ejemplo 2-7 presenta efecto similar para el control positivo a una dosis de 100 mg/kg o más y efecto más excelente que el control positivo a una dosis de 150 mg/kg.

4-3. Medición del efecto antihistamínico

Con el fin de medir el efecto antihistamínico del extracto de hoja de hiedra, y el extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra (Ejemplos 2-1 a 2-11) preparado en el Ejemplo 2 en mastocitos, se llevó a cabo el experimento mediante el mismo método descrito en el "Método del Experimento" en el Experimento 3-3 usando el método de Honuchi et al. (Masako Honuchi y Yoshiyuki Seyma, *J. Health Sci.* 52(6), 711~717, 2006, Naoki Inagaki et. *Biol. Pharm. Bull.* 24(7), 829~834, 2001), cuyos resultados se presentan en la siguiente Tabla 13. Y, para el Ejemplo 2-7 que muestra la actividad más excelente, se midieron los efectos antihistamínicos de acuerdo con la dosis y los resultados se presentan en la siguiente Tabla 14.

30 **Tabla 13**

	Dosis oral (mg/kg)	Concentración de tratamiento de mastocitos (mg/ml)	Cantidad de liberación de histamina (%)
Ejemplo 2-1	200	0	48
		0,1	42
		1,0	39
		10,0	32
Ejemplo 2-2	200	0	47
		0,1	41
		1,0	38
		10,0	31
Ejemplo 2-3	200	0	41
		0,1	37
		1,0	34

ES 2 637 807 T3

		Dosis oral (mg/kg)	Concentración de tratamiento de mastocitos (mg/ml)	Cantidad de liberación de histamina (%)
			10,0	28
Ejemplo 2-4	200	0	39	
		0,1	37	
		1,0	33	
		10,0	26	
Ejemplo 2-5	200	0	37	
		0,1	34	
		1,0	31	
		10,0	25	
Ejemplo 2-6	200	0	36	
		0,1	34	
		1,0	31	
		10,0	24	
Ejemplo 2-7	200	0	34	
		0,1	32	
		1,0	29	
		10,0	20	
Ejemplo 2-8	200	0	35	
		0,1	33	
		1,0	30	
		10,0	22	
Ejemplo 2-9	200	0	38	
		0,1	35	
		1,0	31	
		10,0	27	
Ejemplo 2-10	200	0	42	
		0,1	39	
		1,0	36	
		10,0	31	
Ejemplo 2-11	200	0	49	
		0,1	44	
		1,0	39	
		10,0	30	
Extracto de hoja de hiedra	200	0	45	
		0,1	40	
		1,0	35	
		10,0	34	
Control positivo	Ketotifeno	5	0	44
			0,01	41
			0,1	32
			1,0	19

Tabla 14

		Dosis oral (mg/kg)	Concentración de tratamiento de mastocitos (mg/ml)	Cantidad de liberación de histamina (%)
Ejemplo 2-7		100	0	49
			0,1	39
			1,0	35
			10,0	34
		200	0	34
			0,1	32
			1,0	29
			10,0	20
		400	0	21
			0,1	18
			1,0	17
			10,0	17
Extracto de hoja de hiedra		200	0	45
			0,1	40
			1,0	35
			10,0	34
Control positivo	Ketotifeno	5	0	44
			0,01	41
			0,1	32
			1,0	19

Como se muestra en la Tabla 13, se identifica que el extracto de hoja de hiedra y los extractos combinados de los Ejemplos 2-1 a 2-11 tienen efecto antihistamínico. Particularmente, se muestra que si se combinan el extracto de hoja de hiedra y el extracto de Rhizoma Coptidis que presentan respectivamente actividad antihistamínica, ocurre sinergia. Y, la anterior Tabla 14 muestra los resultados de evaluación del Ejemplo 2-7 que tiene la actividad más excelente de acuerdo con la dosis, y se muestra que el material del Ejemplo 2-7 presentan actividad antihistamínica excelente.

4-4. Experimento para la supresión de broncoconstricción (in vitro)

Con el fin de medir los efectos de supresión de broncoconstricción del extracto de hoja de hiedra y los extractos combinados de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra (Ejemplos 2-1 a 2-11) preparados en el Ejemplo 2, se llevó a cabo el experimento usando el método de Casoni GL et al. (*Clin Exp Allergy.*, 33, 999-1004, 2003, *Anesth Analg.*, 89, 191-196, 1999, *Br J Pharmacol.*, 128, 577-584, 1999) en el siguiente procedimiento.

Se administró intraperitonealmente pentobarbital de sodio (75/ mg/kg) a conejillos de indias Hartely macho (350-400 g, Daechan Biolink) para anestesiarlo y, a continuación, se extrajo la tráquea. La tráquea extraída se cortó a aproximadamente 3 ~ 5 mm en solución de Krebs-Henseleit para dividirla en segmentos y, a continuación, se fijó en un baño de órgano y se perfundió con histamina 10^{-4} M para contraer la tráquea extraída. Y, a continuación, se añadió el material del experimento (0,50 mg/ml) al mismo para medir el cambio en el grado de tensión de la tráquea extraída. Como fármaco de control positivo, se usó dihidrato de nitroprusiato de sodio a una concentración de $2,6 \times 10^{-5}$ mg/ml. Al suponer que la contracción inducida por histamina 10^{-4} M como el 100%, las tasas de relajamiento (%) de los grupos administrados con material del experimento y el grupo administrado con fármaco de control positivo se calcularon restando la tasa de relajamiento (%) del grupo de control con excipiente a la tasa de relajamiento (%) del grupo administrado con material del experimento y el grupo administrado con fármaco de control positivo obtenido bajo las mismas condiciones. Las tasas de relajación de bronquios calculadas (actividad de supresión de broncoconstricción) se mostraron en la Figura 4 y para el Ejemplo 2-7 que muestra la actividad más excelente, se midieron las tasas de relajamiento de tráquea de acuerdo con la dosis y los resultados se presentan en la siguiente Tabla 15.

Tabla 15

		concentración (mg/ml)	rtasa de relajamiento de bronquios (%)
Ejemplo 2-7		0,25	20
		0,50	48
		1,00	83
Grupo control positivo	SNP	2,6x10 ⁻⁵	30

5 Como se muestra en la Figura 4, se identifica que el extracto de hoja de hiedra y los extractos combinados de los Ejemplos 2-1 a 2-11 tienen efecto de supresión de broncoconstricción. Y, se muestra que todos los extractos combinados de los ejemplos 2-1 a 2-11 presentan supresión más incrementada de broncoconstricción que el extracto de hoja de hiedra solo. La anterior Tabla 15 muestra los resultados de la evaluación de las actividades del Ejemplo 2-7 que tiene las actividades más excelentes de acuerdo con la dosis, a partir de lo cual se muestra que el material del Ejemplo 2-7 presenta excelente supresión de broncoconstricción.

10 4-5. Experimento para el efecto antiasmático usando un modelo de asma murino

Con el fin de confirmar el efecto antiasmático usando un modelo de asma murino del extracto combinado del Ejemplo 2-7 que mostró los efectos más excelentes en los Experimentos 4-1 a 4-4, el experimento se llevó a cabo usando el método Tang M.L.K. et al. (*Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 14, 203-210, 2001, *Immunology and Cell Biology* 79, 141-144, 2001, *Journal of Experimental Medicine* 189(10), 1.621-1.629, 1999). Y, para la evaluación, se llevaron a cabo el examen de hipersensibilidad de vías respiratorias (AHR, del inglés "Airway Hyper-Responsiveness") para metacolina, examen del valor de IgE en plasma sanguíneo, examen del número de células y la distribución de glóbulos blancos en fluido de lavado broncoalveolar (BALF, del inglés "Bronchoalveolar Lavage Fluid"), observación del tejido pulmonar y RT-PCR (IL-1 β , IL-4, IL-13r2a).

Método del Experimento

20 A un ratón Balb/c (18 ~ 21 g, Orientbio Inc.), se administró intraperitonealmente una solución de ovalbúmina (OVA, Sigma) para inyección intraperitoneal en una cantidad de 500 μ l (20 μ g como OVA) por un ratón en el Día 0 y el Día 7 y se sensibilizó con una solución preparada para inhalación de OVA usando un nebulizador (NE-U17, OMRON Co. Ltd, Japón) y, a continuación, se inhaló diariamente la solución de OVA al 5 % preparada durante 30 minutos desde el Día 14 al Día 20. Como fármaco de control positivo, se usaron 30 mg/kg de Montelukast sodio y todos los materiales del experimento se usaron en una cantidad de 200 mg/kg. Y, se administraron oralmente el fármaco de control positivo y los materiales del experimento diariamente una hora antes de la inhalación de OVA durante 7 días desde el Día 14 al Día 20 después de la sensibilización y, a continuación, se llevaron a cabo los experimentos mediante los siguientes puntos de evaluación.

1) Examen de la hipersensibilidad de vías respiratorias (AHR) a metacolina

30 24 horas después de la inhalación final de OVA (en el Día 21), se colocó el ratón en un pletismógrafo de cuerpo completo (BUXCO, EE.UU.), se tomaron cada 0,4 ml de soluciones de metacolina de las concentraciones de 0, 10 y 20 mg/ml para introducir las en un aerosol y se administraron por inhalación al ratón respectivamente durante 3 minutos. Y, se midieron los Penh durante 4 minutos a partir del tiempo de inhalación y el valor promedio se ajustó como Penh (pausa mejorada) a la dosis correspondiente de metacolina.

35 2) Examen del valor de IgE en plasma sanguíneo (Día 21)

Para el animal medido de acuerdo con 1), se recogió aproximadamente 0,05 ml de sangre por muestreo sanguíneo orbital y se centrifugó y el plasma obtenido se dividió en dos partes y se diluyó a 1:10 para examinar el valor de inmunoglobulina E (IgE) en plasma a través del análisis inmunoabsorbente ligado a enzima IgE (ELISA; kit de ELISA IgE para ratón, ME-151, SHIBAYAGI Co., Ltd., JAPÓN).

40 3) Examen del número de células y la distribución de glóbulos blancos en fluido de lavado broncoalveolar (BALF) (Día 22)

A los animales cuya sangre se muestreó de acuerdo con 2), se inyectó intraperitonealmente pentotal sódico (50 mg/kg) para anestesiarlo. Y, a continuación, mientras se fijó el pulmón izquierdo con pinzas, 0,4 ml de solución PBS se inyectó en el bronquio y pulmón y, a continuación, se extrajo y se tomó su solución lavada, lo cual se repitió tres veces. Y, se centrifugó la solución a 1.500 g y se desechó el sobrenadante y, a continuación, se añadió 0,2 ml de PBS al precipitado para volverlo a suspender. Para la suspensión, se midieron los números de leucocitos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos totales usando analizadores de hematología automáticos (Contador Coulter Advia 120, BAYER, Alemania).

4) Observación del tejido pulmonar

El pulmón izquierdo fijado con una pinza se extrajo y se fijó con una solución de formalina al 10 % durante un día y, a continuación, tejido penetrado con parafina usando un procesador de tejido se cortó a un grosor de 3-4 μ m usando un micrótopo para obtener fragmentos de tejido. El corte preparado se tiñó con eosina y el portaobjetos se cubrió con bálsamo y se observó con un microscopio para examinar el grado de oclusión de bronquiolo e infiltración de células inflamatorias.

5) RT-PCR

El tejido pulmonar derecho se quitó rápidamente y se guardó a -80°C antes del experimento. Se separó ARN del tejido usando RNA-Bee (Tel-Test Inc. EE.UU.) y el ARN separado se cuantificó a 260 nm usando un espectrómetro y, a continuación, 4 μ g de ARN y Oligo dT 2 μ l (Promega), se añadió agua DEPC para formar 10 μ l y la mezcla se hizo reaccionar a 65°C durante 5 minutos. Y, a continuación, se introdujeron 5x 5 μ l de tampón de reacción + 2 μ l de RTasa + 5 μ l de dNTP + 1 μ l de inhibidor de RNasa + 2 μ l de agua DEPC, y los 25 μ l totales de una mezcla se hicieron reaccionar a 42°C durante 1 hora y a 100°C durante 5 minutos para preparar ADNc. Todos los reactivos usados se compraron a PROMEGA. Se llevó a cabo una PCR con iniciadores preparados (IL-1 β , IL-4, IL-13r2a). Los iniciadores usados son los siguientes:

IL-1 β sentido: 5'-TCATGGGATGATGATGATAACCTGCT-3' (Secuencia N° 1),

IL-1 β antisentido: 5'-CCCATACTTTAGGAAGACACGGATT-3' (Secuencia N° 2);

IL-4 sentido: 5'-TCATCGGCATTTTGAACGAG-3' (secuencia N° 3),

IL-4 antisentido: 5'-GAATCCAGGCATCGAAAAGC-3' (Secuencia N° 4);

IL-13r2a sentido: 5'-GGTTATGCCAAATGCACTTGAG-3' (Secuencia N° 5),

IL-13r2a antisentido: 5'-ATGGCTTTTTGTGCATATCAGAT-3' (Secuencia N° 6).

Las condiciones de la PCR son 32 ciclos de 94°C 30 segundos, 56°C 30 segundos y 72°C 1 minuto. El reactivo de PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2 % y se tiñó con BrEt y, a continuación, se irradió UV y se comparó la densidad y se dividió por densidad de actina para analizar el valor.

Resultados del Experimental

1) Examen de la hipersensibilidad de vías respiratorias (AHR) a metacolina

La hipersensibilidad a metacolina de Montelukast (del DR. Reddy) usado como fármaco de control positivo, extracto de hoja de hiedra y los extractos combinados de los Ejemplos 2-7 se presentan en la siguiente Tabla 16.

Tabla 16

		Valor de Penh de acuerdo con la dosis de metacolina		
		0 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml
Grupo normal		1,2 \pm 0,1	1,7 \pm 0,2	6,0 \pm 2,4
Grupo inducido		1,5 \pm 0,2	14,3 \pm 3,0	29,7 \pm 12,2
Ejemplos 2-7 (200 mg/kg)		1,5 \pm 0,2	7,5 \pm 2,1	15 \pm 4,9
Extracto de hoja de hiedra (200 mg/kg)		1,4 \pm 0,2	8,2 \pm 2,5	18,1 \pm 5,9
Control positivo	Montelukast (30 mg/kg)	1,5 \pm 0,2	8,4 \pm 2,4	19,8 \pm 5,4

Como se muestra en la anterior Tabla 16, los extractos combinados de los Ejemplos 2-7 presentan efecto más excelente para suprimir la hipersensibilidad de vías respiratorias que el extracto de hoja de hiedra solo.

2) Examen del valor de IgE en plasma

Los valores de IgE en plasma de Montelukast (del Dr. Reddy) usado como fármaco de control positivo, extracto de hoja de hiedra y los extractos combinados de los Ejemplos 2-7 de acuerdo con las concentraciones se presentan en la siguiente Tabla 17.

Tabla 17

	Nivel de IgE (ng/ml)
Grupo normal	0,6 \pm 0,2
Grupo inducido	19,7 \pm 6,1
Ejemplos 2-7 (200 mg/kg)	9,6 \pm 3,2

Extracto de hoja de hiedra (200 mg/kg)		11,0±4,8
Control Positivo	Montelukast (30 mg/kg)	13,7±5,7

Como muestra la anterior Tabla 17, el grupo que recibe los materiales de los Ejemplos 2-7 de la presente invención tiene valor IgE inferior, que media la inflamación, que el grupo que recibe el extracto de hoja de hiedra solo y el grupo que recibe fármaco de control positivo.

5 3) El número de células en el fluido de lavado broncoalveolar (BALF)

Los números de neutrófilos y eosinófilos en el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) de montelukast (del Dr. Reddy) usada como fármaco de control positivo, extracto de hoja de hiedra, y los extractos combinados de los ejemplos 2-7 de acuerdo con las concentraciones se presentan en la siguiente tabla 18.

Tabla 18

		WCGB (x10 ³ células)	
		NEU	EOS
Grupo Normal		16,3±3,4	4,7±2,7
Grupo Inducido		24,0±6,1	414,7±168,2
Ejemplos 2-7 (200 mg/kg)		16,3±11,3	296,7±300,1
Extracto de hoja de hiedra (200 mg/kg)		18,7±7,1	369,3±232,2
Control positivo	Montelukast (30 mg/kg)	22,3±7,2	466,0±207,0

10

Como se muestra en la anterior Tabla 18, el grupo que recibe los materiales de los Ejemplos 2-7 tiene conteo inferior de glóbulos blancos relacionados con la inflamación (neutrófilos, eosinófilos) que el grupo que recibe el extracto de hoja de hiedra solo y el grupo que recibe el fármaco de control positivo.

4) Observación del tejido pulmonar

15 Los grados de oclusión de bronquiolo e infiltración de células inflamatorias de Montelukast usado como fármaco de control positivo, extracto de hoja de hiedra y los extractos combinados de los Ejemplos 2-7 de acuerdo con las concentraciones se presentan en la siguiente Tabla 19 y las fotografías del tejido pulmonar teñido por tinción de H&E se muestran en la Figura 5. ((a) grupo normal, (b) grupo inducido, (c) grupo de control positivo, (d) Ejemplos 2-7). En la siguiente Tabla 19, 1=No, 2=ligero, 3=delgado, 4=moderado, 5=grueso de acuerdo con los grados de oclusión e infiltración de células inflamatorias.

20

Tabla 19

		Observación microscópica	
		Grado de oclusión de bronquios	Grado de infiltración de células inflamatorias
Grupo Normal		0±0	0±0
Grupo Inducido		3,3±0,5	3,8±0,4
Ejemplos 2-7 (200 mg/kg)		1,8±0,4	1,9±0,4
Extracto de hoja de hiedra (200 mg/kg)		2,0±0,0	2,3±0,5
Control positivo	Montelukast (30 mg/kg)	3,5±0,5	3,7±0,5

25 Como se muestra en la anterior Tabla 19, los extractos combinados de los Ejemplos 2-7 presentan efecto más excelente para suprimir la oclusión de bronquios y la infiltración de células inflamatorias que el extracto de hoja de hiedra y fármaco de control positivo.

5) RT-PCR

Las tasas de expresión de citoquinas mediadoras de la inflamación (IL-1β, IL-4, IL-13r2a) de Montelukast usado como fármaco de control positivo y los materiales del experimento de los Ejemplos 2-7 de acuerdo con las concentraciones se presentan en la siguiente Tabla 20. En la Tabla 20, cada valor se obtiene dividiendo la densidad de cada citoquina de acuerdo con la irradiación de UV por la densidad de actina.

30

Tabla 20

		Grado de expresión de citoquina		
		IL-1 β	IL-4	IL-13r2a
Grupo Normal		0,58 \pm 0,27	0,58 \pm 0,21	0,56 \pm 0,49
Grupo Inducido		0,94 \pm 0,39	1,96 \pm 0,98	1,20 \pm 0,67
Ejemplos 2-7 (200 mg/kg)		0,16 \pm 0,74	0,83 \pm 0,67	0,29 \pm 0,96
Extracto de hoja de hiedra (200 mg/kg)		1,21 \pm 0,62	0,14 \pm 0,70	0,60 \pm 0,70
Control positivo	Montelukast (30 mg/kg)	0,51 \pm 0,26	1,47 \pm 0,48	0,37 \pm 0,31

Como se muestra en la anterior Tabla 20, en el grupo que recibe los materiales de los Ejemplos 2-7, la expresión de citoquinas mediadoras de la inflamación (IL-1 β , IL-4, IL-13r2a) se suprime más en comparación con el grupo que recibe el extracto de hoja de hiedra solo y el grupo que recibe el fármaco de control positivo.

5 Ejemplo 5. Formulación del extracto de Rhizoma Coptidis

5-1. Preparación de polvo

El extracto de Rhizoma Coptidis (Ejemplo 1-1)	20 mg
Lactosa	100 mg
Talco	10 mg

Los ingredientes anteriores se mezclaron y llenaron en un saco sellado para preparar un polvo.

5-2. Preparación de comprimido

El extracto de Rhizoma Coptidis (Ejemplo 1-2)	10 mg
Almidón de maíz	100 mg
Lactosa	100 mg
Estearato de magnesio	2 mg

10 Los ingredientes anteriores se mezclaron y se comprimieron por el método común de preparación de comprimidos para preparar un comprimido.

5-3. Preparación de cápsula

El extracto de Rhizoma Coptidis (Ejemplo 1-3)	10 mg
Celulosa cristalina	3 mg
Lactosa	14,8 mg
Estearato de magnesio	0,2 mg

Los ingredientes anteriores se mezclaron por el método común de preparación de cápsulas y se llenaron en una cápsula de gelatina para preparar una cápsula.

5-4. Preparación de inyección

El extracto de Rhizoma Coptidis (Ejemplo 1-4)	10 mg
Manitol	180 mg
Agua estéril para inyección	2.974 mg
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	26 mg

Se preparó una ampollita (2 ml) con los contenidos anteriores de los ingredientes por el método común de preparación de inyección.

5-5. Preparación de solución

El extracto de Rhizoma Coptidis (Ejemplo 1-1)	20 mg
Jarabe de maíz con alto contenido de Fructosa	10 mg
Manitol	5 mg
Agua purificada	cantidad adecuada

5 De acuerdo con el método común de preparación de solución, cada ingrediente se añadió a agua purificada y se disolvió en la misma y se añadió limón a la misma en una cantidad adecuada. Y, a continuación, los ingredientes anteriores se mezclaron y se añadió agua purificada a la misma de manera que la cantidad total llegó a ser de 100 ml y se llenó en una botella marrón y se esterilizó para preparar una solución.

5-6. Preparación de alimento saludable

El extracto de Rhizoma Coptidis (Ejemplo 1-2)	1.000 mg
Acetato de vitamina A	70 µg
Vitamina E	1,0 mg
Vitamina B1	0,13 mg
Vitamina B2	0,15 mg
Vitamina B6	0,5 mg
Vitamina B12	0,2 µg
Vitamina C	10 mg
Biotina	10 µg
Amida de ácido nicotínico	1,7 mg
Ácido fólico	50 µg
Pantotenato de calcio	0,5 mg
Mezcla de minerales	cantidad adecuada
Sulfato ferroso	1,75 mg
Óxido de zinc	0,82 mg
Carbonato de magnesio	25,3 mg
Fosfato de potasio monobásico	15 mg
Fosfato de calcio dibásico	55 mg
Citrato de potasio	90 mg
Carbonato de calcio	100 mg
Cloruro de magnesio	24,8 mg

10 Las relaciones anteriores de vitaminas y mezcla de minerales ilustran un ejemplo preferible de mezcla de ingredientes relativamente adecuada para alimento saludable; sin embargo, se pueden modificar las relaciones. Y los ingredientes anteriores se pueden mezclar de acuerdo con un método común de preparación de alimentos saludables y, a continuación, formarse como un gránulo y usarse para la preparación de una composición de alimento saludable por el método común.

5-7. Preparación de bebida saludable

El extracto de Rhizoma Coptidis (Ejemplo 1-3)	1.000 mg
Ácido cítrico	1.000 mg

Oligosacárido		100 g
Concentrado de albaricoque japonés		2 g
Taurina		1 g
Agua purificada	añadida de manera que alcanza una cantidad total de	900 ml

Los ingredientes anteriores se mezclaron de acuerdo con un método común de preparación de bebidas saludables y se calentaron con agitación a 85 °C durante aproximadamente 1 hora y, a continuación, la solución preparada se filtró para recoger en un recipiente de 2 l esterilizado, se esterilizó con sello y se almacenó con refrigeración.

- 5 as relaciones anteriores ilustran un ejemplo preferible de mezcla de ingredientes relativamente adecuada para una bebida favorita; sin embargo, puede modificarse de acuerdo con el gusto regional y étnico tal como una clase de demanda, un país de demanda, uso, etc.

Ejemplo 6. Formulación del extracto combinado de Rhizoma Coptidis con hoja de hiedra

6-1. Preparación de comprimido

- 10 200 mg del extracto combinado del Ejemplo 2-7, 10 mg de ácido silícico anhidro ligero, 2 mg de estearato de magnesio, 50 mg de celulosa microcristalina, 25 mg de ácido glicólico de sodio de almidón, 113 mg de almidón de maíz y cantidad adecuada de etanol anhidro se mezclaron y se comprimieron en un comprimido por un método común.

6-2. Preparación de alimento saludable

Extracto combinado (Ejemplo 2-7)	1.000 mg
Acetato de vitamina A	70 µg
Vitamina E	1,0 mg
Vitamina B1	0,13 mg
Vitamina B2	0,15 mg
Vitamina B6	0,5 mg
Vitamina B12	0,2 µg
Vitamina C	10 mg
Biotina	10 µg
Amida de ácido nicotínico	1,7 mg
Ácido fólico	50 µg
Pantotenato de calcio	0,5 mg
Mezcla de minerales	cantidad adecuada
Sulfato ferroso	1,75 mg
Óxido de zinc	0,82 mg
Carbonato de magnesio	25,3 mg
Fosfato de potasio monobásico	15 mg
Fosfato de calcio dibásico	55 mg
Citrato de potasio	90 mg
Carbonato de calcio	100 mg
Cloruro de magnesio	24,8 mg

- 15 Las relaciones anteriores de vitamina y mezcla de minerales ilustran un ejemplo preferible de mezcla de ingredientes relativamente adecuada para un alimento saludable; sin embargo, se pueden modificar las relaciones. Y los

ingredientes anteriores se pueden mezclar por un método común de preparación de alimento saludable y, por tanto, formarse como un gránulo y usarse para la preparación de alimento saludable por el método común.

6-3. Preparación de bebida saludable

Extracto combinado (Ejemplo 2-7)	1.000 mg
Ácido cítrico	1.000 mg
Oligosacárido	100 g
Concentrado de albaricoque japonés	2 g
Taurina	1 g
Agua purificada	añadida de manera que alcanza una cantidad total de 900 ml

5 Los ingredientes anteriores se mezclaron por un método común de preparación de bebida saludable y, a continuación, se calentaron con agitación a 85 °C durante aproximadamente 1 hora y, a continuación, la solución obtenida se filtró y se introdujo en un recipiente de 2 l esterilizado, y se esterilizó con sello y se almacenó con refrigeración.

10 Las relaciones anteriores ilustran un ejemplo preferible de mezcla de ingredientes relativamente adecuada para una bebida favorita; sin embargo, las relaciones se pueden modificar de acuerdo con el gusto regional y étnico tal como una clase de demanda, un país de demanda, uso, etc.

Los ingredientes anteriores se mezclaron por un método común de preparación de bebida saludable y, a continuación, se calentaron con agitación a 85 °C durante aproximadamente 1 hora y, a continuación, la solución obtenida se filtró y se introdujo en un recipiente de 2 l esterilizado, y se esterilizó con sello y se almacenó con refrigeración.

15 Las relaciones anteriores ilustran un ejemplo preferible de mezcla de ingredientes relativamente adecuada para una bebida favorita; sin embargo, las relaciones se pueden modificar de acuerdo con el gusto regional y étnico tal como una clase de demanda, un país de demanda, uso, etc.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un extracto de Rhizoma Coptidis como principio activo para su uso en la supresión de tos o eliminación de esputo, en la que el extracto de Rhizoma Coptidis es un extracto crudo que se obtiene usando uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 4 carbonos o una solución acuosa de alcohol C₁₋₄ como disolvente de extracción, o un extracto soluble en disolvente que se obtiene añadiendo una solución acuosa de alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 6 carbonos al extracto crudo.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición además comprende un extracto de hoja de hiedra y la composición está en forma de un extracto combinado de Rhizoma Coptidis y hoja de hiedra, en la que el extracto de hoja de hiedra es un extracto crudo que se obtiene usando uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en agua y alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 4 carbonos como disolventes de extracción, o un extracto soluble en disolvente que se obtiene añadiendo una solución acuosa de alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 6 carbonos al extracto crudo.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la relación en peso del extracto de hoja de hiedra y el extracto de Rhizoma Coptidis es de 0,1:1 a 10:1 (el peso de extracto de hoja de hiedra:el peso de extracto de Rhizoma Coptidis), preferiblemente 0,2:1 a 5:1.
4. Una composición que comprende una combinación de un extracto de Rhizoma Coptidis y un extracto de hoja de hiedra como principio activo para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad respiratoria, y la composición está en forma de un extracto combinado de Rhizoma Coptidis y hoja de hiedra
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la relación en peso del extracto de hoja de hiedra y el extracto de Rhizoma Coptidis es de 0,1:1 a 10:1 (el peso de extracto de hoja de hiedra:el peso de extracto de Rhizoma Coptidis) preferiblemente 0,2:1 a 5:1
6. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en la que la enfermedad respiratoria se selecciona del grupo que consiste en enfisema pulmonar, bronquitis, asma, broncoconstricción crónica o aguda, síndrome infantil estriduloso, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, adenoma bronquial, nódulo pulmonar solitario, tuberculosis pulmonar, piotorax, absceso pulmonar, resfriado común, gripe e histiocitosis pulmonar.
7. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que el extracto es un extracto crudo que se obtiene usando uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en agua y alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 4 carbonos como disolvente de extracción, o un extracto soluble en disolvente que se obtiene añadiendo al extracto crudo una solución acuosa de alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 6 carbonos.
8. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición se formula en polvo, gránulo, comprimido, cápsula, suspensión, emulsión, jarabe, aerosol, agente transdérmico, supositorio o solución de inyección estéril.
9. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en la preparación de un alimento funcional saludable para prevenir o mejorar la enfermedad respiratoria.
10. Una composición para su uso como antitusivo o expectorante, que comprende un extracto de Rhizoma Coptidis como principio activo, en la que el extracto de Rhizoma Coptidis es un extracto crudo que se obtiene usando uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 4 carbonos o una solución acuosa de alcohol C₁₋₄ como disolvente de extracción, o un extracto soluble en disolvente que se obtiene añadiendo una solución acuosa de alcohol lineal o ramificado que tiene 1 a 6 carbonos al extracto crudo.
11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la composición comprende además cualquiera de las características enumeradas en las reivindicaciones 2 o 3.
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 o 11, en la que la dosis de la composición por día es de 0,5 a 500 mg/kg, basado en la cantidad del principio activo.
13. Una composición para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad respiratoria, que comprende una combinación de un extracto de Rhizoma Coptidis y un extracto de hoja de hiedra como principio activo, y la composición se administra en forma de un extracto combinado de Rhizoma Coptidis y hoja de hiedra.
14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la composición comprende además cualquiera de las características enumeradas en la reivindicación 5 o 12.

15. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la enfermedad respiratoria se selecciona del grupo que consiste en enfisema pulmonar, bronquitis, asma, broncoconstricción crónica o aguda, síndrome infantil estriduloso, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, adenoma bronquial, nódulo pulmonar solitario, tuberculosis pulmonar, pletorax, absceso pulmonar, resfriado común, gripe e histiocitosis pulmonar.

5

FIG. 1

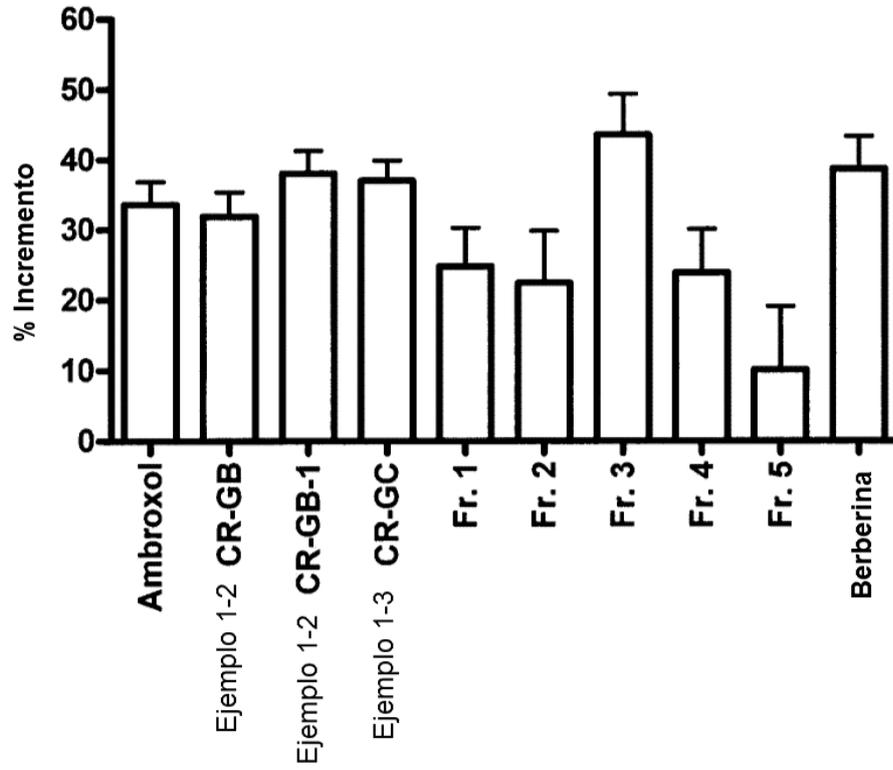


FIG. 2

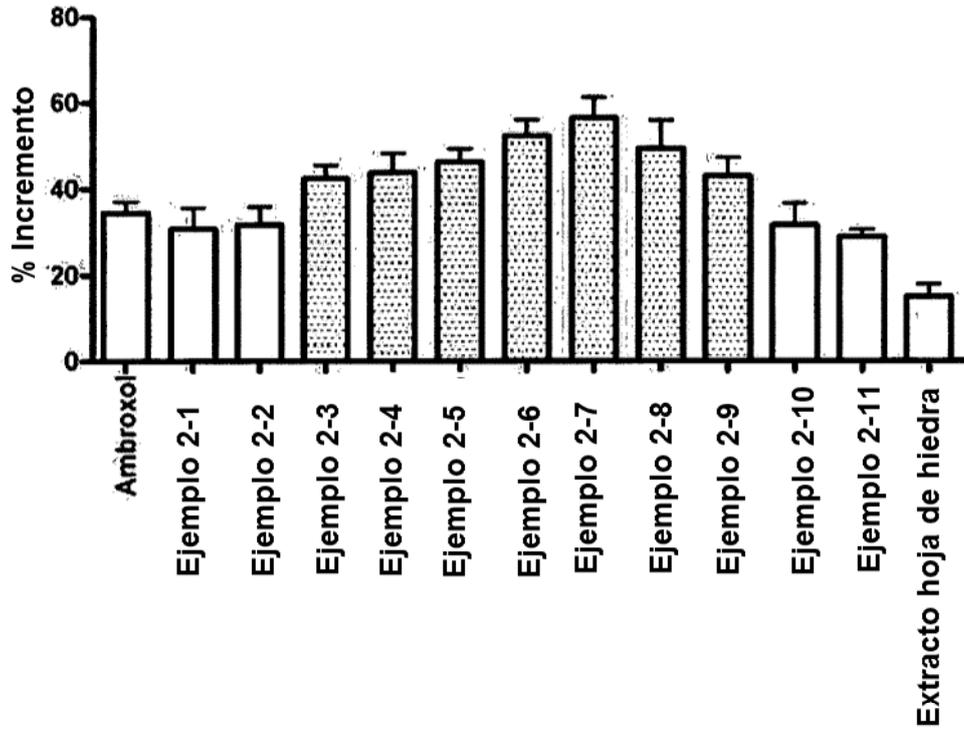


FIG. 3

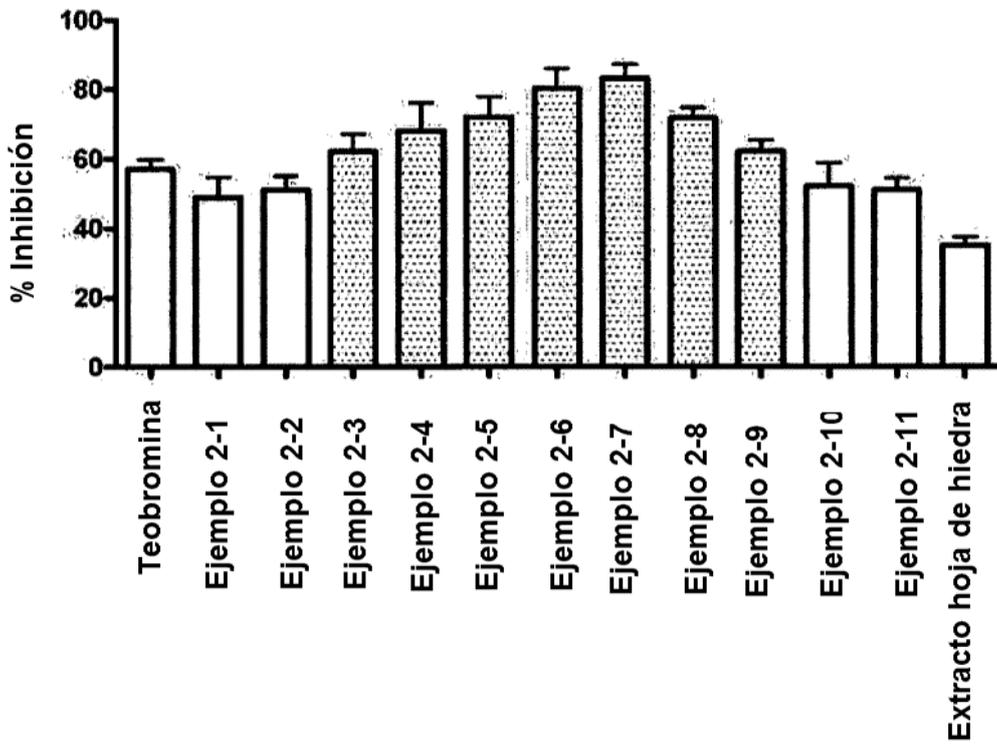


FIG. 4

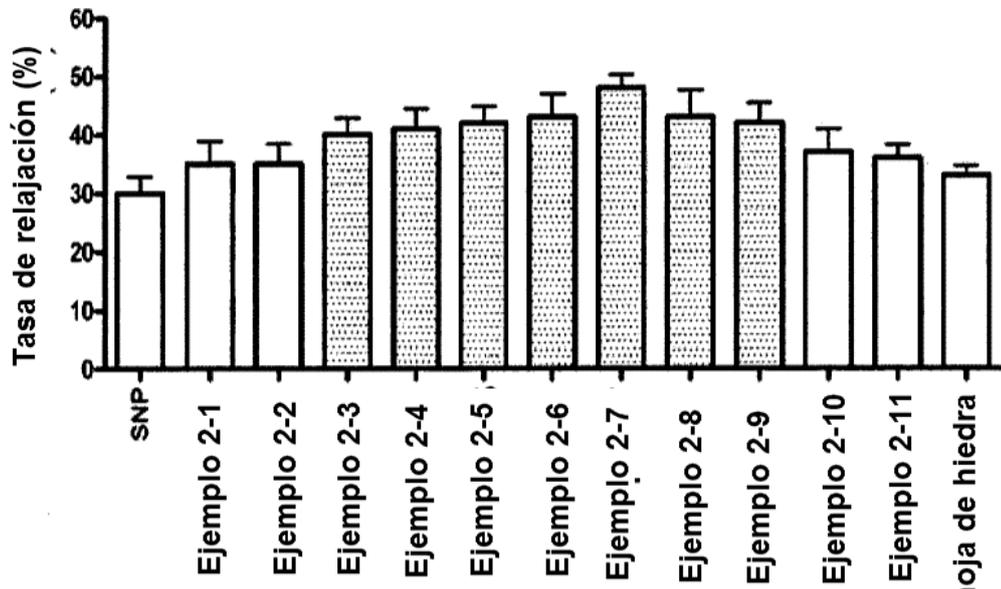
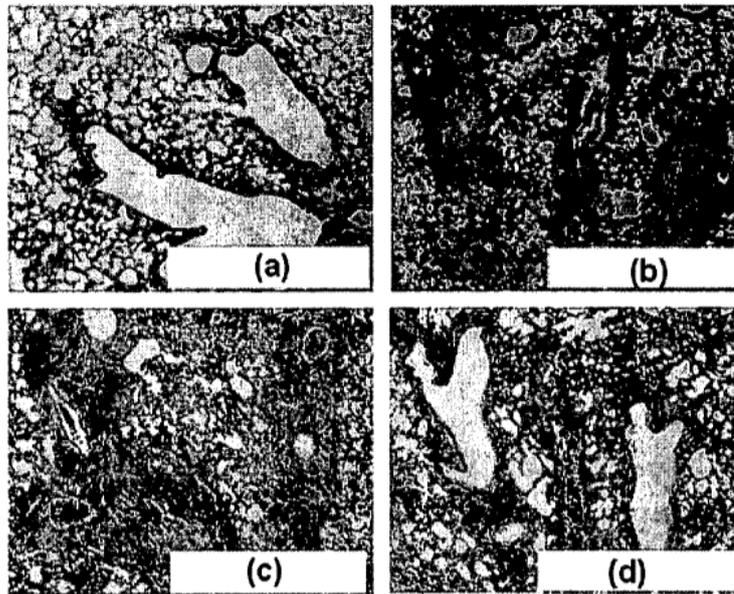


FIG. 5



Extracto de hoja de hiedra