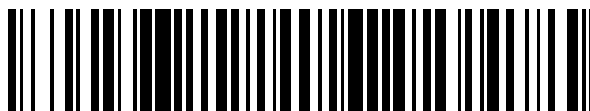


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 265**

51 Int. Cl.:

A61K 36/80 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A23L 27/10 (2006.01)
A23L 33/105 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2013 PCT/KR2013/011986**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14104672**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2013 E 13869176 (1)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 2941263**

54 Título: **Un extracto purificado aislado de Pseudolysimachion rotundum var. subintegrum que contiene una abundante cantidad de ingrediente activo, su preparación, y la composición que lo comprende como un ingrediente activo para prevenir o tratar la inflamación, la alergia y el asma**

30 Prioridad:

31.12.2012 KR 20120158130
17.07.2013 KR 20130084167

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.07.2019

73 Titular/es:

YUNGJIN PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)
1057, Cheonho-daero, Gangdong-gu
Seoul 134-721, KR y
KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE
AND BIOTECHNOLOGY (50.0%)

72 Inventor/es:

LEE, YONGNAM;
YOO, JI-SEOK;
SHIN, DAE-HEE;
RYOO, BYUNG-HWAN;
OH, SEI-RYANG;
AHN, KYUNG-SEOP;
LEE, HYEONGKYU;
KWON, OK-KYOUNG;
KIM, DOO-YOUNG;
KIM, JUNG-HEE y
SONG, HYUK-HWAN

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 2 719 265 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).

DESCRIPCION

Un extracto purificado aislado de *Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum* que contiene una abundante cantidad de ingrediente activo, su preparación, y la composición que lo comprende como un ingrediente activo para prevenir o tratar la inflamación, la alergia y el asma

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) del extracto *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*, el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria, una composición farmacéutica que comprende el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) ,
10 la composición farmacéutica que comprende el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) para uso en el tratamiento y prevención de una enfermedad inflamatoria, un alimento natural funcional que comprende el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1), y el alimento natural funcional que comprende el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria.

Antecedentes de la técnica

15 Generalmente, una respuesta inflamatoria es una respuesta normal del cuerpo humano asociado a un edema, un dolor etc, en caso de que un tejido o una célula reciban cualquier invasión que cause un cambio orgánico en el tejido o célula. Recientemente, se ha descubierto que varias clases de citoquinas están implicadas en la enfermedad inflamatoria.

La reacción alérgica puede clasificarse en cuatro categoría, es decir, tipo I, II, III y IV según los tipos de respuesta o
20 dos categorías, es decir, una reacción alérgica de tipo inmediato tal como de tipo I, II o III, y una reacción alérgica de tipo retardada como de tipo IV según los tipos de periodo desde el tiempo de re-sensibilización causado por un alérgeno hasta el tiempo del comienzo de la reacción.

Entre estas, la alergia de tipo I, mediada por el anticuerpo IgE y denominada como alergia de tipo anafilaxis, provoca asma bronquial, enfermedades atópicas como dermatitis o gastroenteritis, etc, rinitis alérgica como polinosis,
25 conjuntivitis alérgica, alergia alimentaria y similares.

El asma está considerada como un síndrome complejo de las vías respiratorias que se caracteriza por varios síntomas clínicos, por ejemplo, tos, disnea causada por la obstrucción del flujo respiratorio, inflamación aguda o crónica de las vías respiratorias, hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR por sus siglas en inglés) y remodelación estructural y se puede recuperar de manera reversible o irreversible. La mayoría de los asmias es una
30 enfermedad alérgica y se caracteriza por la inflamación crónica de las vías respiratorias y hipersensibilidad bronquial (Minoguchi K y Adachi M., Pathophysiology of asthma. In: Cherniack NS, Altose MD, Homma I. editores. Rehabilitation of the patient with res-piratory disease. New York: McGraw-Hill, 1999, pp97-104).

El asma puede clasificarse en dos tipos, es decir, asma extrínseco y asma intrínseco. El asma extrínseco está provocado por una exposición al antígeno y muestra una reacción positiva en un test en piel o en el test de provocación bronquial contra el antígeno. Generalmente se da en personas cada vez más jóvenes. Está causado principalmente por el ácaro del polvo Dermatophagoides y polen, epitelio de animal, hongo y demás. El asma intrínseco está causado por infecciones de las vías respiratorias superiores, ejercicio, inestabilidad emocional, condiciones meteorológicas de humedad y es común en pacientes adultos. También, el antígeno IgE del asma extrínseco puede detectarse con un test en la piel debido al aumento de IgE en suero.
35

Con respecto a la patofisiología, el asma se reconoce por una inflamación crónica regulada por las células colaboradoras T (Th2) y una variedad de mediadores inflamatorios, como citoquinas, quimioquinas, moléculas de señalización, moléculas de adhesión y factores de crecimiento, de células inmunes y las células estructurales en las vías respiratorias están implicadas en varias etapas del asma (Elias JA et al., J Clin Invest.,111, pp 291-7, 2003). Las células inflamatorias activadas como eosinófilos, mastocitos, macrófago alveolar etc, en los bronquios de
45 pacientes que sufren de asma, liberan varias mediadores inflamatorios como cisteinil-leucotrienos, prostaglandinas etc, y están implicados en la potente constricción bronquial (Maggi E., Immunotechnology 3, pp 233-244, 1998; Pawankar R. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 1, pp3-6, 2001; Barnes PJ et al., Pharmacol. Rev. 50, pp515-596, 1998).

Según esto, ya que la reproducción de varias citoquinas implicadas en la activación de las células inflamatorias, como IL-4, IL-5, IL-13 etc, e IgE y reproducción de cisteinil-leucotrienos liberados de las células inflamatorias son las principales causas de inflamación, la reacción alérgica y asma, han sido muy estudiadas hasta ahora para
50 desarrollar los agentes inhibidores de su reproducción.

Los presentes inventores se han enfocado en desarrollar un potente agente de tratamiento derivado de fuentes naturales con seguridad y eficacia como plantas, animales etc, que tienen una potente actividad inhibidora de la reproducción de células inflamatorias y finalmente, han encontrado que el extracto de *Pseudolysimachion longifolium* muestra una potente actividad anti-inflamatoria, anti-alérgica y anti-asma (Patente coreana N°. 10-860080) y varios de sus compuestos aislados como, verprósido (6-O-3,4-dihidroxibenzoil-catalpol), picrósido II (6-O-
55

4-hidroxi-3-metoxibenzoil-catalpol), verminósido (6-O-3,4-dihydroxicinamoil-catalpol), 6-O-veratroil-catalpol (6-O-3,4-dimetoxibenzoil-catalpol), minecósido (6-O-3-hidroxi-4-metoxicinamoil-catalpol), catalpol y similares, también mostraron una potente actividad anti-inflamatoria, anti-alérgica y anti-asma (Patente coreana publicación N° 10-2006-125499).

5 La solicitud de patente internacional WO 2006/129964 se refiere a una composición farmacéutica que comprende un extracto de *Pseudolysimachion longifolium* y los derivados aislados del catalpol que tienen actividad anti-inflamatoria, anti-alérgica y antiasmática.

Oh SR et al. (International Immunopharmacology, vol. 6, no. 6, 1 Junio 2006, pp. 978-086) describen el efecto supresor del veroprósido aislado de *Pseudolysimachion longifolium* sobre la inflamación de las vías respiratorias en un modelo de ratón con asma alérgico.

La tesis de máster de Kim, Hanbat National University, Corea, de Enero 01, 2007, páginas 1-46, se refiere al análisis de iridoideas del género *Pseudolysimachion* en Corea.

15 Sin embargo, han tenido dificultades en la producción masiva e industrialización usando el extracto de *Pseudolysimachion longifolium* ya que el extracto de la planta contiene muy pocos ingredientes activos como los derivados de catalpol.

Pseudolysimachion rotundum var *subintegrum* es una hierba perenne distribuida por Corea, China, Japón, Ostrov Sakhalin, y Rusia.

Hyuk-Hwan Song et al. (6th KRIBB Poster Festival, 13 Diciembre 2012, p. 28) describen el aislamiento preparativo de un nuevo compuesto iridoide de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* por cromatografía ultra rápida a contra corriente.

25 Basándonos en los estudios previos sobre la actividad anti-inflamatoria, anti-alérgica y anti-asma del extracto de *Pseudolysimachion longifolium* descrito en la patente coreana N° 10-860080, los presentes inventores han intentado desarrollar un método más eficaz para preparar ingredientes más potentes y más abundantes que muestren una actividad anti-inflamatoria, anti-alérgica y anti-asma aislados del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.

Sin embargo, no han descrito o presentado nada sobre el método eficaz para preparar ingredientes más potentes y más abundantes que muestren una actividad anti-inflamatoria, anti-alérgica y anti-asma aislados del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* que los de la bibliografía citada anteriormente.

30 Según esto, los presentes inventores han encontrado el nuevo método industrializado para preparar un extracto purificado que contiene ingredientes activos más abundantes como derivados de catalpol del extracto *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* y el extracto purificado mostró más actividad anti-inflamatoria, anti-alérgica y anti-asma que el preparado mediante el método convencional de preparación descrito en la técnica anterior mediante varios ensayos *in vivo* como el ensayo de inhibición de la reproducción de eosinófilos, la liberación de inmunoglobina y quimioquinas inflamatorias en plasma y fluido broncoalveolar al igual que la supresión de las 35 hipersensibilidad de las vías respiratorias e hiperplasia de las células calciformes en un modelo de ratón sensibilizado con/estimulado con OVA.

Descripción de la invención

40 De acuerdo con esto, el problema que subyace en la presente invención se define por el contenido de las reivindicaciones independientes anejas. Las realizaciones preferidas pueden tomarse de las reivindicaciones dependientes anejas.

Más específicamente, el problema que subyace en la presente invención se resuelve en un primer aspecto con un extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) del extracto *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*, preparado mediante el método: añadir etanol al 30-80% al *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* deshidratado y someter a una extracción acuosa en frío, a una temperatura que va de 10 a 60°C, durante un periodo que va de 6 horas a 48 horas; posteriormente, someter a extracción a reflujo con agua caliente, a una temperatura que va de 40 a 120°C, durante un periodo que va de 6 horas a 48 horas, para dar el primer extracto en la primera etapa; suspender el primer extracto en aproximadamente 1-5 veces en volumen (v/v) de agua, añadirle 1-10 veces en volumen (v/v) de butanol, fraccionar entre una fase de agua y una fase de butanol y recoger la fase de butanol para dar el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) que contiene 15 - 50% (v/v) de verprósido, 0.3 - 10 % (v/v) de ácido verátrico, 0.5 - 10 % (p/p) de catalpósido, 0.3 - 10 % (p/p) de picrósido II, 0.3 - 10 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 0.5 -10 % (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol basado en el peso total del extracto (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.

55 Más específicamente, el problema que subyace en la presente invención se resuelve en un segundo aspecto con un extracto fraccionado con butanol (ATC1) del extracto *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* preparado mediante el método: añadir etanol al 30-80% al *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* deshidratado y

someter a una extracción acuosa en frío a una temperatura que va de 10 a 60°C, durante un periodo que va de 6 horas a 48 horas; posteriormente, someter a extracción a reflujo con agua caliente, a una temperatura que va de 40 a 120°C, durante un periodo que va de 6 horas a 48 horas, para dar el primer extracto en la primera etapa; suspender el primer extracto en aproximadamente 1-5 veces en volumen (v/v) de agua, añadirle 1-10 veces en volumen (v/v) de butanol, fraccionar entre una fase de agua y una fase de butanol y recoger la fase de butanol para dar el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) que contiene 12.3 - 47% (p/p) de derivados de catalpol seleccionados del grupo que consiste en verprósido, catalpósido, picróside II, isovanilloil-catalpol y 6-O-veratroil-catalpol en el extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* y que muestra la relación relativa de la mezcla (p/p) entre el peso de cada derivado de catalpol, de 15.0 -18.0 (p/p) de verprósido, 2.10 -2.60 (p/p) de catalpósido, 1 (p/p) de picróside II, 1.00 -1.30 (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2.00 - 2.30 (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol.

Más específicamente, el problema que subyace en la presente invención se resuelve en un tercer aspecto con una composición farmacéutica que comprende el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) según el primer y segundo aspecto, que incluye una de sus realizaciones, aislado de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* como un ingrediente activo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Además, el problema que subyace en la presente invención se resuelve en un cuarto aspecto con la composición farmacéutica según el tercer aspecto, que incluye uno cualquiera de sus aspectos, para su uso en el tratamiento y prevención de una enfermedad inflamatoria seleccionada entre eczema, dermatitis atópica, conjuntivitis, enfermedad periodontal, rinitis, otitis media, laringofaringitis, amigdalitis, neumonía, úlcera gástrica, gastritis, enfermedad de Crohn, colitis, hemorroide, gota, espondilitis anquilosante, fiebre reumática, lupus sistémico eritematoso, fibromialgia, artritis psoriática, osteoartritis, artritis reumática, periartrosis del hombro, tendinitis, tenosinovitis, peritendinitis, miositis, hepatitis, cistitis, nefritis, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria crónica, o enfermedad inflamatoria aguda; enfermedad alérgica seleccionada entre rinitis alérgica, asma, dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticarias, alergia alimentaria, o alergia a los fármacos; o enfermedad asmática seleccionada entre cualquier asma provocado por varios factores externos seleccionados entre ácaros del polvo, piel o caspa de animales, cucarachas, alimentos, fármaco, tos, humo de cigarro, contaminación del aire, aditivos alimentarios, actividad física como ejercicio, cambios climáticos, arena amarilla o estrés.

El problema que subyace en la presente invención se resuelve en un quinto aspecto con un alimento natural funcional que comprende un extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) según el primer y segundo aspecto, que incluye cualquiera de sus realizaciones, aislado de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum*.

Adicionalmente, el problema que subyace en la presente invención se resuelve en un sexto aspecto con el alimento natural funcional según el sexto aspecto, que incluye una cualquiera de sus realizaciones, para uso en la prevención o alivio de la enfermedad seleccionada entre eczema, dermatitis atópica, conjuntivitis, enfermedad periodontal, rinitis, otitis media, laringofaringitis, amigdalitis, neumonía, úlcera gástrica, gastritis, enfermedad de Crohn, colitis, hemorroide, gota, espondilitis anquilosante, fiebre reumática, lupus sistémico eritematoso, fibromialgia, artritis psoriática, osteoartritis, artritis reumática, periartrosis del hombro, tendinitis, tenosinovitis, peritendinitis, miositis, hepatitis, cistitis, nefritis, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria crónica, o enfermedad inflamatoria aguda; enfermedad alérgica seleccionada entre rinitis alérgica, asma, dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticarias, alergia alimentaria, o alergia a los fármacos; o enfermedad asmática seleccionada entre cualquier asma provocado por varios factores externos seleccionados entre ácaros del polvo, piel o caspa de animales, cucarachas, alimentos, fármaco, tos, humo de cigarro, contaminación del aire, aditivos alimentarios, actividad física como ejercicio, cambios climáticos, arena amarilla o estrés.

El problema que subyace en la presente invención se resuelve también en un séptimo aspecto con el extracto purificado que contiene el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) según el primer y segundo aspecto, que incluye una cualquiera de sus realizaciones, aislado de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum*, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria seleccionada entre eczema, dermatitis atópica, conjuntivitis, enfermedad periodontal, rinitis, otitis media, laringofaringitis, amigdalitis, neumonía, úlcera gástrica, gastritis, enfermedad de Crohn, colitis, hemorroide, gota, espondilitis anquilosante, fiebre reumática, lupus sistémico eritematoso, fibromialgia, artritis psoriática, osteoartritis, artritis reumática, periartrosis del hombro, tendinitis, tenosinovitis, peritendinitis, miositis, hepatitis, cistitis, nefritis, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria crónica, o enfermedad inflamatoria aguda; enfermedad alérgica seleccionado entre rinitis alérgica, asma, dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticarias, alergia alimentaria, o alergia a los fármacos; o enfermedad asmática seleccionada entre cualquier asma provocado por varios factores externos seleccionados entre ácaros del polvo, piel o caspa de animales, cucarachas, alimentos, fármaco, tos, humo de cigarro, contaminación del aire, aditivos alimentarios, actividad física como ejercicio, cambios climáticos, arena amarilla o estrés.

La presente invención tal como se ha definido en las reivindicaciones está basada por lo tanto en un nuevo método para preparar un extracto purificado que contiene abundantes ingredientes activos como derivados de catalpol de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* y el extracto preparado a partir de él.

La expresión "derivados de catalpol" descrita en este texto comprende verprósido, catalpósido, picróside II,

isovanilloil-catalpol y 6-O-veratroil-catalpol etc.

La expresión "*Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*" descrita en este texto comprende la planta cultivada o desarrollada naturalmente y la planta disponible comercialmente, sin la intención de limitarse a estas en este texto.

5 La expresión "nuevo extracto purificado" descrita en este texto comprende (a) el extracto purificado fraccionado con butanol (designado como "ATC1" de ahora en adelante) y (b) el extracto purificado con el fraccionamiento secundario (designado como "ATC2" de ahora en adelante).

10 Específicamente, la expresión "el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1)" se caracteriza porque contiene 15 - 50 % (p/p) de verprósido, 0.3 - 10 % (p/p) de ácido verátrico, 0.5 - 10 % (p/p) de catalpósido, 0.3 - 10 % (p/p) de picrósido II, 0.3 - 10 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 0.5 - 10 % (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol basado en el peso total del extracto (100 %) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*; preferiblemente, 20 - 25 % (p/p) de verprósido, 0.5 - 5 % (p/p) de ácido verátrico, 1 - 5 % (p/p) de catalpósido, 0.5 - 5 % (p/p) de picrósido II, 0.5 - 5 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 1 - 5 % (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol basado en el peso total del extracto (100 %) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*; ;

15 o caracterizado por contener 12.3 - 47 % (p/p) de derivados de catalpósido en el extracto total (100 %) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* y que tiene la relación relativa de la mezcla (p/p) entre el peso de cada derivado de catalpósido, de 15.0 - 18.0 (p/p) de verprósido, 2.10 - 2.60 (p/p) de catalpósido, 1 (p/p) de picrósido II, 1.00 - 1.30 (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2.00 - 2.30 (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol; preferiblemente, 16.0 - 17.0 (p/p) de verprósido, 2.20 - 2.50 (p/p) de catalpósido, 1 (p/p) de picrósido II, 1.10 - 1.20 (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2.10 - 2.20 (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol; más preferiblemente, 16.20 - 16.99 (p/p) de verprósido, 2.40 - 2.45 (p/p) de catalpósido, 1 (p/p) de picrósido II, 1.10 - 1.19 (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2.10 - 2.19 (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol.

20 Más específicamente, la expresión "el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1)" se caracteriza porque se prepara mediante el procedimiento: añadir etanol al 30-80% al *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* deshidratado en la primera etapa; someter a una extracción acuosa en frío, a una temperatura que va de 10 a 60°C, durante un periodo que va de 6 horas a 48 horas y la extracción a reflujo con agua caliente, a una temperatura que va de 40 a 120°C durante un periodo que va de 6 horas a 48 horas para dar el primer extracto en la primera etapa, suspender el primer extracto en aproximadamente 1-5 veces en volumen (v/v) de agua; y añadirle 1-10 veces en volumen (v/v) de butanol, fraccionar entre una fase de agua y una fase de butanol y recoger la fase de butanol para dar el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) que contiene 15 - 50% (v/v) de verprósido, 0.3 - 10 % (v/v) de ácido verátrico, 0.5 - 10 % (p/p) de catalpósido, 0.3 - 10 % (p/p) de picrósido II, 0.3 - 10 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 0.5 -10 % (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol basado en el peso total del extracto (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* adecuado para tratar y prevenir una enfermedad inflamatoria, alérgica o asmática.

35 También se describe un método para preparar el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) aislado de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* que comprende las etapas de, añadir al menos un disolvente de extracción seleccionado entre agua, alcohol inferior C₁-C₄ como metanol, etanol, butanol etc, o sus mezclas, preferiblemente, mezcla de agua y etanol, más preferiblemente etanol al 30-80% (p/p) en *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* deshidratado en la primera etapa; someter a al menos un método de extracción seleccionado entre extracción a reflujo con agua caliente, extracción con agua fría, ultra-sonicación o extracción convencional, preferiblemente extracción con agua fría seguido de extracción a reflujo a una temperatura que va de 10 a 100°C, preferiblemente de 20 a 90°C, durante un periodo que va de 30 min a 72 horas, preferiblemente 6 a 48 horas, más preferiblemente extracción con agua fría a una temperatura que va de 10 a 60°C, preferiblemente de 20 a 50°C, durante un periodo que va de 30 min a 72 horas, preferiblemente 6 a 48 horas y luego extracción a reflujo a una temperatura que va de 40 a 120°C, preferiblemente 60 a 90°C, durante un periodo que va de 30 min a 72 horas, preferiblemente 6 a 48 horas, repetidamente, para dar el primer extracto y segundo extracto; suspender el primer extracto en aproximadamente 0.5 - 10 veces en volumen (v/v), preferiblemente, aproximadamente 1 - 5 veces en volumen (v/v) de agua para dar un extracto suspendido en la tercera etapa; y añadir aproximadamente 0.5 - 20 veces en volumen (v/v), preferiblemente, aproximadamente 1 - 10 veces en volumen (v/v) de butanol, fraccionar entre una fase de agua y una fase de butanol y recoger la fase de butanol para dar el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) que contiene 15 - 50 % (p/p) de verprósido 0.3 - 10 % (p/p) de ácido verátrico, 0.5 - 10 % (p/p) de catalpósido, 0.3 - 10 % (p/p) de picrósido II, 0.3 - 10 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 0.3 - 10 % (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol basado en el peso total de extracto (100 %) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* para tratar y prevenir una enfermedad inflamatoria, alérgica o asmática.

55 Específicamente, la expresión "el extracto purificado con el fraccionamiento secundario (ATC2)" se caracteriza porque contiene 30 - 60 % (p/p) de verprósido, 0.5 - 10 % (p/p) de ácido verátrico, 2 - 20 % (p/p) de catalpósido, 1 - 10 % (p/p) de picrósido II, 1 - 10 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2 - 20 % (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol basado en el peso total de extracto (100 %) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*; preferiblemente, 40 - 50 % (p/p) de verprósido, 1 - 5 % (p/p) de ácido verátrico, 3 - 10 % (p/p) de catalpósido, 2 - 5 % (p/p) de picrósido II, 2 - 8 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 3 - 8 % (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol basado en el peso total de extracto (100 %) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*;

o caracterizado porque contiene 36.5 - 91 % (p/p) de derivados de catalpósido en el extracto total (100 %) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* y tiene la relación relativa de la mezcla (p/p) entre el peso de cada derivado de catalpósido, de 13.0 - 16.0 (p/p) de verprósido, 2.20 - 2.50 (p/p) de catalpósido, 1 (p/p) de picróside II, 1.10 - 1.40 (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2.00 - 2.20 (p/p) de 6-O-veratroil-catapol; preferiblemente, 14.0 - 15.0 (p/p) de verprósido, 2.30 - 2.45 (p/p) de catalpósido, 1 (p/p) de picróside II, 1.20 - 1.35 (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2.00 - 2.10 (p/p) de 6-O-veratroil-catapol; más preferiblemente, 14.50 - 14.99 (p/p) de verprósido, 2.35 - 2.43 (p/p) de catalpósido, 1 (p/p) de picróside II, 1.25 - 1.34 (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2.01 - 2.09 (p/p) de 6-O-veratroil-catapol.

Más específicamente, la expresión “el extracto purificado con el fraccionamiento secundario (ATC2)” se caracteriza porque se prepara mediante el procedimiento de añadir al menos un disolvente de extracción seleccionado entre agua, alcohol inferior C1-C4 como metanol, etanol, butanol etc, o sus mezclas, preferiblemente, mezcla de agua y etanol, más preferiblemente etanol 30-80 (p/p) en agua a *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* deshidratado en la primera etapa; someter a al menos un método de extracción seleccionado entre extracción a reflujo con agua caliente, extracción con agua fría, ultra-sonicación o extracción convencional, preferiblemente extracción con agua fría seguida de extracción a reflujo a una temperatura que va de 10 a 100°C, preferiblemente de 20 a 90°C, durante un periodo que va de 30 min a 72 horas, preferiblemente 6 a 48 horas, más preferiblemente, extracción con agua fría a una temperatura que va de 10 a 60°C, preferiblemente de 20 a 50°C, durante un periodo que va de 30 min a 72 horas, preferiblemente 6 a 48 horas y luego extracción a reflujo a una temperatura que va de 40 a 120°C, preferiblemente 60 a 90°C, durante un periodo que va de 30 min a 72 horas, preferiblemente 6 a 48 horas, repetidamente, para dar el primer extracto en la segunda etapa; suspender el primer extracto en aproximadamente 0.5 - 10 veces en volumen (v/v), preferiblemente, aproximadamente 1 - 5 veces en volumen (v/v) de agua para dar un extracto suspendido en la tercera etapa; añadir aproximadamente 0.5 - 20 veces en volumen (v/v), preferiblemente, aproximadamente 1 - 10 veces en volumen (v/v) de butanol, fraccionar entre una fase de agua y una fase de butanol y recoger la fase de butanol para dar el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) en la tercera etapa; y someter el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) a al menos un procedimiento de purificación seleccionado entre el grupo que consiste en cromatografía de partición en fase reversa, cromatografía de partición en fase normal, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de exclusión por tamaño para dar el extracto purificado con el segundo fraccionamiento (ATC2) que contiene 30 - 60 % (p/p) de verprósido, 0.5 - 10 % (p/p) de ácido verátrico, 2 - 20 % (p/p) de catalpósido, 1 - 10 % (p/p) de picróside II, 1 - 10 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2 - 20 % (p/p) de 6-O-veratroil-catapol basado en el peso total de extracto (100 %) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* para tratar y prevenir una enfermedad inflamatoria, alérgica o asmática.

También se describe un método para preparar el extracto purificado con el segundo fraccionamiento (ATC2) aislado de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* que comprende las etapas de; añadir al menos un disolvente de extracción seleccionado entre agua, alcohol inferior C1-C4 como metanol, etanol, butanol etc, o sus mezclas, preferiblemente, mezcla de agua y etanol, más preferiblemente etanol 30-80 (p/p) en agua en *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* deshidratado en la primera etapa; someter a al menos un método de extracción seleccionado entre extracción a reflujo con agua caliente, extracción con agua fría, ultra-sonicación o extracción convencional, preferiblemente extracción con agua fría seguido de extracción a reflujo a una temperatura que va de 10 a 100°C, preferiblemente de 20 a 90°C, durante un periodo que va de 30 min a 72 horas, preferiblemente 6 a 48 horas, más preferiblemente, extracción con agua fría a una temperatura que va de 10 a 60°C, preferiblemente de 20 a 50°C, durante un periodo que va de 30 min a 72 horas, preferiblemente 6 a 48 horas y luego extracción a reflujo a una temperatura que va de 40 a 120°C, preferiblemente 60 a 90°C, durante un periodo que va de 30 min a 72 horas, preferiblemente 6 a 48 horas, repetidamente, para dar el primer extracto en la segunda etapa; suspender el primer extracto en aproximadamente 0.5 - 10 veces en volumen (v/v), preferiblemente, aproximadamente 1 - 5 veces en volumen (v/v) de agua para dar un extracto suspendido en la tercera etapa; añadir aproximadamente 0.5 - 20 veces en volumen (v/v), preferiblemente, aproximadamente 1 - 10 veces en volumen (v/v) de butanol, fraccionar entre una fase de agua y una fase de butanol y recoger la fase de butanol para dar el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) en la tercera etapa; y someter el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) a al menos un procedimiento de purificación adicional seleccionado entre el grupo que consiste en cromatografía de partición en fase reversa, cromatografía de partición en fase normal, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de exclusión de tamaño para dar el extracto purificado con el fraccionamiento secundario (ATC2) que contiene 30 - 60 % (p/p) de verprósido, 0.5 - 10 % (p/p) de ácido verátrico, 2 - 20 % (p/p) de catalpósido, 1 - 10 % (p/p) de picróside II, 1 - 10 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2 - 20 % (p/p) de 6-O-veratroil-catapol basado en el peso total de extracto (100 %) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* para tratar y prevenir una enfermedad inflamatoria, alérgica o asmática.

Específicamente, la expresión “procedimiento de purificación adicional” se selecciona entre (i) cromatografía de partición en fase reversa, (ii) cromatografía de partición en fase normal, (iii) cromatografía de intercambio iónico o (iv) cromatografía de exclusión de tamaño, preferiblemente, cromatografía de partición en fase reversa o cualquier cromatografía usando cualquier resina como una fase estacionaria que pueda retener una sustancia no polar mientras eluye una sustancia polar, por ejemplo, resina Sephadex como Sephadex, Sephadex LH20, Sephadex G-25, Sephadex G-10, Sepharose, Superdex, resina de metilacrilato, carboximetil-celulosa, sulfopropil-celulosa, carboximetil Sephadex, sulfopropil Sephadex, carboximetil Sepharose, sulfopropil Sepharose y similares; resina polimérica de fase reversa usando copolímero estireno-divinilbenceno como Polymer X, HP20, PRP-h1 Polymer y similares o resina con soporte metacrilato etc; gel de sílice normal como el producto BPC (cromatografía de fase

enlazada), producto de sílice obtenido en YMC Co Ltd, producto de sílice obtenido en DAISO Co. Ltd, producto de sílice obtenido en ASahi Co. Ltd, producto de sílice obtenido en COSMOSYL Co. Ltd y similares; producto ODS usado para filtros de HPLC como producto ODS obtenido en YMC Co. Ltd, producto ODS obtenido en DAISO Co. Ltd, producto ODS obtenido en ASahi Co. Ltd, producto ODS obtenido en CHEMCO Co. Ltd, producto ODS obtenido en Merck Co. Ltd producto ODS obtenido en COSMOSYL Co. Ltd producto ODS obtenido en FUJI Co. Ltd y similares.

Cuando se opta (i) por la cromatografía de partición en fase reversa como un procedimiento de purificación adicional la "fase estacionaria en la cromatografía de partición en fase reversa descrita anteriormente" puede ser cualquier fase estacionaria como una sustancia de fase reversa como una fase estacionaria que puede retener una sustancia no polar mientras se eluye la sustancia polar, preferiblemente, una fase estacionaria basada en gel de sílice, fase estacionaria basada en polímero como poliestireno etc, y similares, más preferiblemente, derivados de gel de sílice como C2, C4, C6, C8, C10, C12, 14, C16, C18 y similares; o una fase estacionaria basada en polímero como PS-2, Oasis HLB y similares, más y más preferiblemente gel de sílice de fase reversa (C18 (IV)-D), producto ODS-A/ODS-AQ de YMC Co. Ltd., producto SP-C-ODS de CHEMCO Co. Ltd., producto SP-ODS-RPS de DAISO Co. Ltd., producto 5C18 de COSMOSYL Co. Ltd., producto Chromatorex de FUJI Co. Ltd., etc.

Cuando se opta (i) por la cromatografía de partición en fase reversa como un procedimiento de purificación adicional la "fase móvil en la cromatografía de partición en fase reversa (i) descrita anteriormente" puede ser al menos un disolvente seleccionado entre agua, acetonitrilo, alcohol inferior como metanol, etanol, butanol, etc, tetrahidrofurano (THF) o sus mezclas, preferiblemente agua, alcohol inferior como metanol, etanol, butanol etc, o sus mezclas, más preferiblemente, la mezcla de disolventes agua y metanol, más y más preferiblemente la mezcla de disolventes agua y metanol empezando de 90:10 (v/v) a 60:40 (v/v) para eluir la sustancia polar.

Cuando se opta (ii) por la cromatografía de partición en fase normal como un procedimiento de purificación adicional, la "fase estacionaria en la cromatografía de partición en fase normal (ii) descrita anteriormente" puede ser cualquier fase estacionaria como una sustancia de fase normal como una fase estacionaria que pueda retener una sustancia polar mientras se eluye una sustancia no polar, preferiblemente, gel de sílice, Fluorosyl, o fase estacionaria basada en alúmina, fase estacionaria basada en polímero con restos CN, Diol, o NH₂ y similares, más preferiblemente, gel de sílice, Fluorosyl, o fase estacionaria basada en alúmina, etc.

Cuando se opta (ii) por la cromatografía de partición en fase normal como un procedimiento de purificación adicional, la "fase móvil en la cromatografía de partición en fase normal (ii) descrita anteriormente" puede ser al menos un disolvente seleccionado entre hexano, heptano, acetato de etilo, etanol, dietiléter, 2-propanol o sus mezclas, preferiblemente, hexano, heptano, acetato de etilo, o sus mezclas para eluir la sustancia no polar.

Cuando se opta (iii) por la cromatografía de intercambio iónico como un procedimiento de purificación adicional, la "fase estacionaria en la cromatografía de intercambio iónico (iii) descrita anteriormente" puede ser cualquier fase estacionaria de alto peso molecular como una fase estacionaria que tiene restos reticulados cargados, preferiblemente, resina de intercambio catiónico, resina de intercambio aniónico, o adsorbente sintético, y similares, más preferiblemente, resina de intercambio catiónico fuertemente ácida como AG 50W-x8, Amberlite IR-120, Dowex 60W-x8, SKIB etc; resina de intercambio catiónico débilmente ácida como Amberlite IRA-67, Dowex 3-x4A etc; resina de intercambio catiónico fuertemente básica como DIAION SKIB, DIAION PK216, DIAION CR20, DIAION UBK555 (Mitsubishi Chemical Co.), TRILITE SPC 160H, TRILITE SPC 180H, TRILITE SPC 400JH (Samyang Co. Ltd.), AMBERLITE 200C Na, AMBERLITE CG50, AMBERLITE CR1310 Na, AMBERJET 200H, AMBERLYST 131 WET, ALBERLYST 232 WET (ROHM and HAAS Co. Ltd.), Lewatit VP OC 1800, Lewatit VP OC 1812, Lewatit MDS1368 Na, Lewatit K1221 (Bayer Co. Ltd.), PUROLITE PCR833CA, PUROLITE C145 (Purolite Co. Ltd.), MFG210, MFG 250 (Finex Co. Ltd.) etc; resina de intercambio aniónica fuertemente básica como SA11A, SA20A, SA21A etc; o CaptoQ (GE Healthcare Co. Ltd.), o la resina con propiedades similares a estas como Toyopearl QEA (Tosoh Co. Ltd.), Q Sepharose FF (GE Healthcare Co. Ltd.), Fractogel EMD, Fractogel TMAE, Fractogel HICAP (Merck KGaA Co. Ltd o Darmstadt Co. Ltd.); más y más preferiblemente, SA21A; adsorbente como SP207, HP20SS, HP20 etc, más preferiblemente, HP 20.

Cuando se opta (iv) por la cromatografía de exclusión de tamaño como un procedimiento de purificación adicional, la "fase estacionaria en la cromatografía de exclusión de tamaño (iv) descrita anteriormente" puede ser cualquier fase estacionaria de tipo gel como una fase estacionaria que puede separar por tamaño de muestra, preferiblemente, gel basado en dextrano como sephadex (por ejemplo, sephadex G-25), gel basado en poli(acrilamida) como Sephacryl (por ejemplo Sephacryl S-400), gel basado en agarosa como Superose o Sepharose (por ejemplo, Sepharose C1-4B), o sus combinaciones como Superdex 200 combinación Dextran (por ejemplo Sephadex™), o gel de agarosa reticulado (Superose™) y similares, sin embargo no se limitará a estos en este texto. La "fase móvil en la cromatografía de exclusión por tamaño (iv) descrita anteriormente" puede ser una solución tampón seleccionado entre el grupo que consiste en tampón acetato de sodio, tampón fosfato de sodio, tampón acetato de amonio, MES [ácido (2-(N-morfolino)etanesulfónico), Bis-Tris[2-Bis(2-hidroxi-etil)amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol]], ADA [N-(2-acetamido)iminodiacetato], PIPES [ácido piperaxino-N,N'-Bis(2-etanesulfónico)], BES [ácido N,N'-Bis(2-hidroxi-etil)-2-aminoetanosulfónico], MOPS [ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico], TES [ácido N-Tris(hidroxi-etil)metil-2-aminoetanosulfónico], HEPES [ácido N-2-hidroxi-etil-piperazino-N'-2-etanosulfónico], y similares; preferiblemente, tampón acetato de sodio, tampón fosfato de sodio, o tampón acetato de amonio.

El procedimiento puede llevarse a cabo también (v) por cromatografía de permeación de gel o cromatografía de filtración en gel además de (i) la cromatografía de partición en fase reversa, (ii) cromatografía de partición en fase normal, (iii) cromatografía de intercambio iónico, (iv) cromatografía de exclusión de tamaño o sus combinaciones, como un procedimiento de purificación adicional descrito en este texto.

- 5 La presente invención tal como se define en las reivindicaciones proporciona también un nuevo extracto purificado, denominado el extracto purificado fraccionado con butanol (designado como "ATC1" de ahora en adelante) mediante los métodos de preparación descritos anteriormente. Además, se describe un extracto purificado con el segundo fraccionamiento (designado como "ATC2" de ahora en adelante).

10 La presente invención tal como se define en las reivindicaciones proporciona también un nuevo extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) del extracto *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* preparado mediante los métodos de preparación descritos anteriormente, que contiene 12.3 - 47 % (p/p) de derivados de catalpósido en el extracto total (100 %) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* donde dichos derivados de catalpósido consisten en 15 - 50 % (p/p) de verprósido, 0.3 - 10 % (p/p) de ácido verátrico, 0.5 - 10 % (p/p) de catalpósido, 0.3 - 10 % (p/p) de picrósido II, 0.3 - 10 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 0.5 - 10 % (p/p) de 6-O-veratroil-catapol, preferiblemente, 20 - 25 % (p/p) de verprósido, 0.5 - 5 % (p/p) de ácido verátrico, 1 - 5 % (p/p) de catalpósido, 0.5 - 5 % (p/p) de picrósido II, 0.5 - 5 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 1 - 5 % (p/p) de 6-O-veratroil-catapol basado en el peso total de extracto (100 %) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.

20 La presente invención tal como se define en las reivindicaciones proporciona también un nuevo extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* preparado mediante los métodos de preparación descritos anteriormente, que muestra la relación relativa de la mezcla (p/p) entre el peso de cada derivado de catalpósido de 15.0 - 18.0 (p/p) de verprósido, 2.10 - 2.60 (p/p) de catalpósido, 1 (p/p) de picrósido II, 1.00 - 1.30 (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2.00 - 2.30 (p/p) de 6-O-veratroil-catapol; preferiblemente, 16.0 - 17.0 (p/p) de verprósido, 2.20 - 2.50 (p/p) de catalpósido, 1 (p/p) de picrósido II, 1.10 - 1.20 (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2.10 - 2.20 (p/p) 6-O-veratroil-catapol; más preferiblemente, 16.20 - 16.99 (p/p) de verprósido, 2.40 - 2.45 (p/p) de catalpósido, 1 (p/p) de picrósido II, 1.10 - 1.19 (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2.10 - 2.19 (p/p) 6-O-veratroil-catapol.

25 La presente descripción proporciona también un nuevo extracto purificado con el segundo fraccionamiento (ATC2) del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* preparado mediante los métodos de preparación descritos anteriormente, que contiene 36.5 - 91 % (p/p) de derivados de catalpósido en el extracto total (100 %) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*, donde dichos derivados de catalpósido consisten en 30 - 60 % (p/p) de verprósido, 0.5 - 10 % (p/p) de ácido verátrico, 2 - 20 % (p/p) de catalpósido, 1 - 10 % (p/p) de picrósido II, 1 - 10 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2 - 20 % (p/p) de 6-O-veratroil-catapol basado en el peso total de extracto (100 %) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*; preferiblemente, 40 - 50 % (p/p) de verprósido, 1 - 5 % (p/p) de ácido verátrico, 3 - 10 % (p/p) de catalpósido, 2 - 5 % (p/p) de picrósido II, 2 - 8 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 3 - 8 % (p/p) de 6-O-veratroil-catapol basado en el peso total de extracto (100 %) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.

30 La presente descripción proporciona también un nuevo extracto purificado con el segundo fraccionamiento (ATC2) del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* preparado mediante los métodos de preparación descritos anteriormente, que muestra la relación relativa de la mezcla (p/p) entre el peso de cada derivado de catalpósido, de 13.0 - 16.0 (p/p) de verprósido, 2.20 - 2.50 (p/p) de catalpósido, 1 (p/p) de picrósido II, 1.10 - 1.40 (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2.00 - 2.20 (p/p) de 6-O-veratroil-catapol; preferiblemente, 14.0 - 15.0 (p/p) de verprósido, 2.30 - 2.45 (p/p) de catalpósido, 1 (p/p) de picrósido II, 1.20 - 1.35 (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2.00 - 2.10 (p/p) de 6-O-veratroil-catapol; más preferiblemente, 14.50 - 14.99 (p/p) de verprósido, 2.35 - 2.43 (p/p) de catalpósido, 1 (p/p) de picrósido II, 1.15 - 1.24 (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2.01 - 2.09 (p/p) de 6-O-veratroil-catapol.

35 La expresión "extracto purificado" descrita en este texto puede usarse en forma seca preparada mediante el método de evaporación a vacío, método de liofilización o método de secado con aire caliente, etc.

40 La expresión "enfermedad inflamatoria" descrita en este texto comprende eczema, dermatitis atópica, conjuntivitis, enfermedad periodontal, rinitis, otitis media, laringofaringitis, amigdalitis, neumonía, úlcera gástrica, gastritis, enfermedad de Crohn, colitis, hemorroide, gota, espondilitis anquilosante, fiebre reumática, lupus sistémico eritematoso, fibromialgia, artritis psoriática, osteoartritis, artritis reumática, periartrosis del hombro, tendinitis, tenosinovitis, peritendinitis, miositis, hepatitis, cistitis, nefritis, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria crónica, enfermedad inflamatoria aguda etc, pero sin la intención de limitarse a estas en este texto, preferiblemente eczema, dermatitis atópica, artritis reumática, enfermedad inflamatoria crónica, enfermedad inflamatoria aguda etc.

45 La expresión "enfermedad alérgica" descrita en este texto comprende rinitis alérgica, dermatitis alérgica, dermatitis de contacto, urticarias, alergia a insectos, alergia a alimentos, alergia a fármacos, conjuntivitis alérgica, hipersensibilidad etc, pero sin la intención de limitarse a estas en este texto, preferiblemente rinitis alérgica, dermatitis alérgica, dermatitis de contacto, urticarias, alergia a insectos, alergia a alimentos, alergia a fármacos, más

preferiblemente dermatitis alérgica, dermatitis de contacto.

La expresión “enfermedad asmática” descrita en este texto comprende cualquier asma provocado por varios factores externos, pero sin la intención de limitarse a estos en este texto, tal como ácaros del polvo, piel o caspa de animales, cucarachas, alimentos, fármacos, tos, humo de cigarro, contaminación del aire, aditivos alimentarios, actividad física como ejercicio, etc, cambios climáticos, arena amarilla, estrés etc.

El término “prevenir” descrito en este texto comprende cualquier acto para inhibir o posponer la aparición de cierta enfermedad o trastorno descrito en este texto por medio de la administración de la composición de la invención; y el término “tratar” descrito en este texto comprende cualquier acto para aliviar o cambiar favorablemente el síntoma asociado a cierta enfermedad o trastorno descrito en este texto por medio de la administración de la composición de la invención.

Los presentes inventores han descubierto que el nuevo método industrializado para preparar el extracto purificado puede proporcionar ingredientes activos más abundantes, es decir, 36.5 % a 91.0 % (p/p) como derivados de catalpol del extracto de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* comparado con el extracto bruto preparado mediante el método convencional descrito en la técnica anterior donde su contenido en derivados de catalpol es solamente 8.49 % (p/p) mediante varios análisis de HPLC, por ejemplo, el extracto purificado (ATC1) de la invención tal como se ha definido en las reivindicaciones contiene 17.60 % (p/p) de verprósido, 0.72 % (p/p) de ácido verátrico, 2.62 % (p/p) de catalpósido, 1.08 % (p/p) de picrósido II, 1.26 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2.36 % (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol (véase ejemplo 2) y el extracto purificado de la invención (ATC2) contiene 43.83 % (p/p) de verprósido, 1.80 % (p/p) de ácido verátrico, 7.07 % (p/p) de catalpósido, 2.93 % (p/p) de picrósido II, 3.85 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 6.15 % (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol mientras el extracto bruto (CX) preparado mediante el método convencional descrito en la técnica anterior contiene solamente 5.9 % (p/p) de verprósido, 0.21 % (p/p) de ácido verátrico, 0.82 % (p/p) de catalpósido, 0.40 % (p/p) de picrósido II, 0.42 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 0.74 % (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol basado en el peso total de extracto (100 %) de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum*; extracto bruto; al igual que el extracto purificado de la invención tal como se define en las reivindicaciones mostró una actividad anti-inflamatoria, anti-alérgica y anti-asma más potente que el preparado mediante el método convencional de preparación siguiendo varios ensayos *in vivo* como el ensayo de inhibición de la reproducción de eosinófilos, la liberación de inmunoglobulina y quimioquinas inflamatorias en plasma y fluido broncoalveolar al igual que la supresión de la hipersensibilidad de las vías respiratorias y la hiperplasia de las células caliciformes en un modelo de ratón sensibilizado con/estimulado con OVA.

De acuerdo con esto, según otro aspecto de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el extracto purificado que contiene abundantes ingredientes activos preparado mediante los métodos descritos anteriormente de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* como un ingrediente activo para el tratamiento y prevención de una enfermedad inflamatoria, alérgica o asmática.

La presente invención tal como se define en las reivindicaciones proporciona un extracto purificado que contiene abundantes ingredientes activos preparado mediante los métodos sujetos de las reivindicaciones de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* como un ingrediente activo y los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento y prevención de una enfermedad inflamatoria, alérgica o asmática.

También se describe el uso del extracto purificado que contiene abundantes ingredientes activos preparados mediante los métodos sujetos de las reivindicaciones de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* para la fabricación de medicamentos empleados para el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria, alérgica o asmática.

La expresión “vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables” definida en este texto comprende “aditivos farmacéuticos, ingredientes inactivos usados para preparar una medicación. Incluyen colorantes, aromatizantes, aglutinantes, emolientes, cargas, lubricantes, conservantes, y muchas más clasificaciones. Los excipientes comunes incluyen almidón de maíz, lactosa, talco, estearato de magnesio, sacarosa, gelatina, estearato de calcio, dióxido de silicio, goma laca y glaseado, que son bien conocidos en la técnica (véase, Home-page of Food and Drug Administration: www.fda.gov o información sobre fármacos online: www.drugs.com) o bibliografía previa (por ejemplo, Rowe, Raymond C et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press, 7ª edición, 2012).

También se describe un método para tratar o prevenir una enfermedad inflamatoria, alérgica o asmática en mamíferos, donde el método comprende la administración de una cantidad eficaz terapéuticamente del extracto purificado que contiene abundantes ingredientes activos preparados mediante los métodos descritos anteriormente de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* para la dolencia en mamíferos a causa de enfermedades inflamatorias, alérgicas o asmáticas.

La composición de la invención tal como se define en las reivindicaciones cuando se usa para tratar y prevenir una enfermedad inflamatoria, alérgica o asmática puede comprender los extractos anteriores de 0.1 ~ 99 %, preferiblemente, 0.1 ~ 50 % en peso basado en el peso total de la composición.

La composición según la presente invención puede proporcionarse como una composición farmacéutica que

5 contiene vehículos adyuvantes o diluyentes farmacéuticamente aceptables, p.ej. lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidones, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metil-celulosa, polivinil-pirrolidona, agua, metilhidroxi-benzoato, propilhidroxi-benzoato, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente cargas, agentes anti-aglutinantes, agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes aromatizantes, emulsionantes, conservantes y similares. Las composiciones de la invención pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, mantenida o retardada del ingrediente activo después de su administración a un paciente al emplear cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica.

10 Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la presente invención tal como se definen en las reivindicaciones pueden disolverse en aceites, propilenglicol u otros disolventes que son usados comúnmente para producir una inyección. Ejemplos adecuados de los vehículos incluyen suero fisiológico, polietilenglicol, etanol, aceites vegetales, isopropil-miristato, etc, pero sin limitarse a estos. Para administración tópica, el extracto de la presente invención puede formularse en forma de ungüentos o cremas.

15 Las formulaciones farmacéuticas tal como se definen en las reivindicaciones pueden prepararse en cualquier forma, como forma de dosificación oral (polvo, comprimido, cápsula, cápsula blanda, medicamento acuoso, jarabe, píldora de elixires, polvo, sobre, gránulo), o preparación tópica (crema, ungüento, loción, gel, bálsamo, parche, pasta, solución en spray, aerosol y similares), o preparación inyectable (solución, suspensión, emulsión).

20 La composición farmacéutica de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones en formas de dosificación farmacéuticas pueden usarse en forma de sales farmacéuticamente aceptables, y también puede usarse sola o en una asociación apropiada, al igual que en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos.

25 La dosis deseable del extracto de la invención tal como se define en las reivindicaciones varía dependiendo del estado y el peso del sujeto, severidad, forma del fármaco, ruta y periodo de administración, y puede seleccionarla aquel experto en la técnica. Sin embargo, con el fin de obtener efectos deseables, se recomienda generalmente administrar en una cantidad que va de 0.0001 a 1000 mg/kg, preferiblemente 0.001 a 100 mg/kg por peso/día del extracto de la invención de la presente invención. La dosis puede administrarse de forma única o dividida en varias veces por día.

30 La composición farmacéutica de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones puede administrarse a un sujeto animal como mamíferos (rata, ratón, animales domésticos o seres humanos) vía diferentes rutas. Todos los modos de administración están contemplados, por ejemplo, la administración puede ser oral, rectal o inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracutánea, intratecal, epidural o intracerebroventricular.

El extracto de la invención de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones puede usarse también como un componente principal o agente aditivo y ayudante en la preparación de varios alimentos naturales funcionales y alimentos naturales.

35 Según esto, es otro objetivo de la presente invención proporcionar un alimento natural funcional que comprende el extracto purificado que contiene abundantes ingredientes activos preparados mediante los métodos descritos anteriormente de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* para la prevención o alivio de una enfermedad inflamatoria, alérgica o asmática.

40 La expresión "alimento natural funcional" define en este texto el alimento natural funcional que tiene una funcionalidad mejorada como una funcionalidad física o funcionalidad fisiológica al añadir el extracto de la presente invención a alimentos convencionales para prevenir o mejorar las enfermedades en cuestión en seres humanos o mamífero.

45 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un alimento natural que comprende el extracto purificado que contiene abundantes ingredientes activos preparados mediante los métodos descritos anteriormente de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*, junto con un aditivo sitiológicamente aceptable para la prevención o alivio de una enfermedad inflamatoria, alérgica o asmática.

50 La expresión "alimento natural" define en este texto "el alimento que contiene el extracto de la presente invención que no muestra un efecto pretendido específico sino un efecto pretendido general en pequeñas parte de la cantidad como una forma de aditivo o en toda la cantidad como una de forma de polvo, gránulo, cápsula, píldora, comprimido, etc.

55 La expresión "aditivo sitiológicamente aceptable" definida en este texto comprende "cualquier sustancia cuyo uso pretendido que resulta o puede esperarse razonablemente que resulta –directa o indirectamente- ser un componente o de otro modo afecta las características de cualquier alimento" y puede clasificarse en tres grupos según su origen, es decir, (1) aditivo sintético químicamente como cetonas, glicina, citrato de potasio, ácido nicotínico, etc; (2) aditivo natural como colorante persimmon, extracto de licorice, celulosa cristalina, goma guar etc; (3) el aditivo mezclado como con L-glutamato de sodio, conservantes, colorante de alquitrán, etc, o varias categorías según su función en la alimentación, por ejemplo, agente espesante, agente de maduración, agente blanqueador, secuestrante,

humectante, agente anti-anglutinante, agentes clarificantes, agente de curación, emulsionante, estabilizante, aglutinante, bases y ácido, agentes espumantes, nutrientes, agente colorante, agente aromatizante, endulzante, agente conservante, antioxidante, etc, que son bien conocidos en la técnica o la bibliografía previa (véase "Codex General Standard for Food Additives" (GSFA, Codex STAN 192-1995) en la página principal de GSFA Online: www.codexalimentarius.net/gсфаonline/index.html).

Si se añade una sustancia a un alimento con un propósito específico en este alimento, es referido como un aditivo directo o aditivos de alimentos indirectos a aquellos que van a formar parte del alimento en trazas debido a su empaquetamiento, almacenamiento u otro manejo.

La expresión "alimentos naturales o alimentos naturales funcionales" descritos en este texto pueden estar contenidos en la alimentación, bebidas naturales, suplementos dietéticos, etc, y pueden formularse en una forma de dosificación farmacéutica como un polvo, gránulo, comprimido, suspensión, emulsión, jarabe, comprimido para mascar, cápsula, bebida, etc; o en forma de alimento, por ejemplo pan, pastel de arroz, fruta deshidratada, caramelos, chocolate, goma de mascar, helado, leche como leche baja en grasa, leche con lactosa hidrolizada, leche de cabra, leche procesada, producto lácteo como leche fermentada, mantequilla, leche concentrada, nata, aceite de mantequilla, queso natural, queso procesado, leche en polvo, suero de leche, etc, productos cárnicos procesados como hamburguesa, jamón, salchicha, bacon, etc, producto procesado a base de huevo, producto procesado a base de pescado como pastel de pescado, etc, productos de tipo fideo como fideos instantáneos, fideos deshidratados, fideos frescos, fideos fritos, fideos no fritos, fideos deshidratados gelatinizados, fideos cocinados, fideos congelados, pasta etc, productos del té como bolsas de té, té filtrado, etc, bebidas naturales como bebidas de frutas, bebidas de verduras, bebidas sin alcohol carbonatadas, bebidas de leche de soja, bebidas lácticas, bebidas mixtas, etc, alimentos sazonadores como salsa de soja, pasta de soja, pasta de pimiento rojo, chunjang (un tipo de producto de soja fermentada coloreado con caramelo), cheonggukjang (soja fermentada natural por *B. subtilis*), pasta mixta, vinagre, salsa, ketchup, curry, aderezo, etc, margarina, manteca, pizza, etc, pero sin la intención de limitarse a estos en este texto, para prevenir o mejorar la enfermedad en cuestión.

También, el extracto descrito anteriormente puede añadirse a alimentos o bebidas para la prevención y mejora del trastorno en cuestión. La cantidad del extracto descrito anteriormente en alimentos o bebidas como un alimento natural funcional o alimento natural puede estar generalmente entre aproximadamente 0.01 a 100 p/p % del peso total del alimento para una composición de un alimento natural funcional. En particular, aunque la cantidad preferida del extracto de la presente invención en el alimento natural funcional, alimento natural o alimento con nutrientes especiales puede variar según el propósito pretendido de cada alimento, se usa preferiblemente en general para usar como un aditivo en la cantidad del extracto de la presente invención que va de aproximadamente 0.01 a 5% en alimentos como fideos y similares, de 40 a 100% en alimentos naturales sobre la relación del 100% de la composición del alimento.

Siempre que la composición de la bebida natural de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones contiene un extracto como se define en las reivindicaciones como un componente esencial en la relación indicada, no existe una limitación particular para el otro componente líquido, donde el otro componente puede ser varios edulcorantes o carbohidratos naturales etc, como bebidas convencionales. Los ejemplos de carbohidrato natural mencionado anteriormente son monosacáridos como glucosa, fructosa etc; disacárido como maltosa, sacarosa, etc; azúcar convencional como dextrina, ciclodextrina; y alcohol azucarado como xilitol, y eritritol etc. Como otro edulcorante diferente de los mencionados anteriormente, edulcorante natural como taumatina, extracto de estevia como levaudiosida, glicirricina et al., y edulcorantes sintéticos tal como sacarina, aspartamo et al., pueden usarse favorablemente. La cantidad de carbohidrato natural descrito anteriormente está generalmente entre aproximadamente 1 a 20 g, preferiblemente 5 a 12 g en la relación de 100 ml de composición de bebida presente.

Los otros componentes de la composición mencionados anteriormente son varios nutrientes, una vitamina, un mineral o un electrolito, agente aromatizante sintético, un agente colorante y un agente mejorador en el caso del queso, chocolate et al., ácido péctico y sus sales, ácido algínico y sus sales, ácido orgánico, adhesivo coloidal protector, agente controlador del pH, estabilizante, un conservante, glicerina, alcohol, agente carbonizante usado en bebida carbonatada et al. El otro componente de los mencionados anteriormente puede ser zumo de fruta para preparar un zumo de fruta natural, bebida a base de zumo de fruta y bebida de vegetales, donde el componente puede usarse independientemente o en combinación. La relación de los componentes no es tan importante pero generalmente está entre aproximadamente 0 a 20 p/p % por 100 p/p % de la composición presente. Ejemplos de alimentos que se pueden añadir que comprenden el extracto mencionado anteriormente son varios alimentos, bebida, goma, complejo vitamínico, alimento que mejora la salud y similares.

El extracto de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones por lo tanto no tiene toxicidad ni efectos adversos; pueden usarse con seguridad.

Efectos ventajosos de la invención tal como se define en las reivindicaciones

Tal como se describe en este texto, el nuevo método industrializado de la invención para preparar el extracto purificado que contiene más abundantes ingredientes activos como derivados de catalpol del extracto *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* y el extracto purificado mostró más actividad anti-inflamatoria, anti-

alérgica y anti-asma que el preparado mediante el método convencional de preparación descrito en la técnica anterior a través de varios ensayos *in vivo* como el ensayo de inhibición sobre la reproducción de eosinófilos, la liberación de inmunoglobulina y quimioquinas inflamatorias en plasma y fluido broncoalveolar al igual que la supresión de la hipersensibilidad de las vías respiratorias e hiperplasia de las células caliciformes en un modelo de ratón sensibilizado con/estimulado con OVA. Por lo tanto, se puede usar como los agentes terapéuticos o alimentos naturales funcionales para el tratamiento y prevención de una enfermedad inflamatoria, alérgica o asmática.

Breve descripción de los dibujos

Los objetivos anteriores y otros, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente con la descripción detallada siguiente tomada junto con los dibujos que acompañan, donde:

- 10 La Fig. 1 muestra el análisis por HPLC del extracto bruto de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* preparado en el ejemplo comparativo 1;
- La Fig. 2 muestra el análisis por HPLC del extracto purificado (ATC1) de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* preparado en el ejemplo 1;
- 15 La Fig. 3 muestra el análisis por HPLC del extracto purificado (ATC2) de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* preparado en el ejemplo 2;
- La Fig. 4 muestra el efecto supresor del extracto purificado sobre la hipersensibilidad de las vías respiratorias en un modelo de ratón sensibilizado con/estimulado con OVA.
- La Fig. 5 muestra el efecto inhibitor del extracto purificado sobre el reclutamiento de las células inflamatorias en el fluido de lavado broncoalveolar;
- 20 La Fig. 6 muestra el efecto inhibitor del extracto purificado sobre la liberación de inmunoglobulina (total IgE) en el suero sanguíneo;
- La Fig. 7 muestra el efecto inhibitor del extracto purificado sobre la liberación de IgE específica de OVA en el suero sanguíneo;
- La Fig. 8 representa el efecto inhibitor del extracto purificado sobre la liberación de IL-1 beta;
- 25 La Fig. 9~11 presenta el efecto inhibitor del extracto purificado sobre la liberación de quimioquinas inflamatorias;
- La Fig. 12, 13 representa el efecto inhibitor del extracto purificado sobre el reclutamiento de las células inflamatorias en células de tejido pulmonar usando el examen histológico del lavado broncoalveolar;
- La Fig. 14, 15 representa el efecto inhibitor del extracto purificado sobre la secreción de mucosidad en las células del tejido pulmonar usando el examen histológico del lavado broncoalveolar.

30 Mejor modo de llevar a cabo la invención

Ejemplos

Ejemplo comparativo 1. Preparación del extracto bruto de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum*

1-1. Preparación del extracto bruto (ATE)

35 1kg de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* deshidratado (cultivado a 244, Soimyeon Eumseong-gun Chungcheongbuk-do en Corea según GAP) se cortó en pequeños trozos y se mezcló con 10 L de etanol al 40%. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas y se extrajo con extracción a reflujo a 78°C durante 12 horas para recoger el filtrado, tres veces. El extracto se filtró con papel de filtro para retirar los residuos. El filtrado recogido se concentró con un rotavapor (EYELA, N-2100, Japón) a 55 ~ 65°C bajo presión reducida y se secó con un liofilizador para obtener 202 g de extracto bruto deshidratado (designado como "ACE" de ahora en adelante) para usar como un ejemplo comparativo.

1-2. Preparación del extracto bruto (ATM)

45 1.1kg de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* deshidratado (cultivado a 244, Soimyeon Eumseong-gun Chungcheongbuk-do en Corea según GAP) se cortó en pequeños trozos y se mezcló con 5 L de metanol. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas y se extrajo con extracción a reflujo a 78°C durante 12 horas para recoger el filtrado, tres veces. El extracto se filtró con papel de filtro para retirar los residuos. El filtrado recogido se concentró con un rotavapor (EYELA, N-2100, Japón) a 55 ~ 65°C bajo presión reducida y se secó con un liofilizador para obtener 100.5 g de extracto bruto deshidratado (designado como "ATM" de ahora en adelante) para usar como un ejemplo comparativo.

1-3. Análisis de los componentes

El análisis de los componentes se llevó a cabo usando un equipo de HPLC, (Agilent modelo 1260, EE.UU) según las condiciones en la Tabla 1 y el resultado se muestra en la Fig.1.

5 Como se puede ver en la Fig.1, se ha confirmado que cada ingrediente se detectó a 9.548 min (verprósido), 10.817 min (ácido verátrico), 16.728 min (catalpósido), 20.346 min (picrósido II), 21.853 min (isovanilloil-catalpol), y 30.462 min (6-O-veratroil-catalpol) respectivamente.

El contenido de cada ingrediente (%) en la muestra se calculó basándose en el perfil de HPLC (tiempo de retención) según la fórmula matemática 1.

[fórmula matemática 1]

10 Contenido de cada ingrediente= conc. del estándar (mg/ml) / conc. de la muestra a ensayar (mg/ml) x

At/As x pureza del estándar (%)

donde “At” designa el área del ingrediente en la muestra a ensayar y “As” lo designa en el estándar siempre que el volumen de muestra de la muestra y estándar a ensayar sea idéntico al otro.

Tabla 1

Condiciones de HPLC			
Condiciones de HPLC			
Bomba	Agilent 1260 Series, 1260 con bomba cuaternaria		
Detector	Agilent 1260 Series, 1260 DAD		
Columna	Agilent Eclipse XOB C18, 4.6 x 50cm, 5µm		
Flujo	1.5 ml/min		
Absorbancia UV	266nm		
Fase móvil	Fase móvil A: tampón fosfato (pH= 3.5) Fase móvil B: metanol		
	Tiempo	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
	0 ~ 5	80	20
	5 ~ 20	75	25
	20 ~ 25	75	25
	25 ~ 30	55	45
	30 ~ 35	55	45
	35 ~ 36	80	20
	36 ~ 40	80	20
Volumen de inyección	10µl		

15 Con el resultado se confirmó que el extracto bruto de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* contenía solamente 8.49 % (p/p) de derivados de catalpósido, es decir, 5.9 % (p/p) de verprósido, 0.21 % (p/p) de ácido verátrico, 0.82 % (p/p) de catalpósido, 0.40 % (p/p) de picrósido II, 0.42 % (p/p) de isovanilloil-catalpol, y 0.74 % (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol, respectivamente, tal como se puede ver en la Tabla 2.

20

Tabla 2

Resultado de HPLC (extracto bruto: ATM)		
Ingrediente activo	Ejemplo comparativo 1	
	Tiempo de retención (min)	
Verprósido	9.548	5.90
Acido verátrico	10.817	0.21
Catalpósido	16.728	0.82
Picrósido II	20.346	0.40
Insovanilloil-catalpol	21.853	0.42
6-O-veratroil-catalpol	30.462	0.74
Total		8.49

Ejemplo 1. Preparación del extracto purificado (ATC1) de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum*

5 El extracto bruto (ACE) de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* preparado mediante el método convencional según el Ejemplo comparativo 1, se suspendió en 2 L de agua destilada y la suspensión se añadió a 2 L de butanol para fraccionar entre la fracción soluble en butanol y la fracción soluble en agua. La fracción soluble en butanol se recogió, se concentró bajo presión reducida y se secó para dar 82 g de extracto purificado de la invención fraccionado con butanol (ATC1) usado como un ejemplo para ensayo.

10 El análisis de los componentes se llevó a cabo usando un equipo de HPLC (Agilent modelo 1260, EE.UU.) según las condiciones de la Tabla 1 y el resultado se muestra en el Fig.2.

Como se puede ver en la Fig.2, se confirmó que cada ingrediente se detectó a 9.545 min (verprósido), 10.821 min (ácido verátrico), 16.727 min (Catalpósido), 20.345 min (Picrósido II), 21.853 min (Isovanilloil-catalpol), y 30.462 min (6-O-veratroil-catalpol) respectivamente.

15 El contenido de cada ingrediente (%) en la muestra se calculó basándose en el perfil de HPLC (tiempo de retención) según la fórmula matemática 1.

Con el resultado, se confirmó que el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* contenía 25.64 % (p/p) de derivados de catalpósido, es decir, 17.60 % (p/p) de verprósido, 0.72 % (p/p) de ácido verátrico, 2.62 % (p/p) de catalpósido, 1.08 % (p/p) de picrósido II, 1.26 % (p/p) de isovanilloil-catalpol, y 2.36 % (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol, respectivamente, tal como se puede ver en la Tabla 3.

20 Tabla 3

Resultado de HPLC (extracto purificado: ATC1)		
Ingrediente activo	Ejemplo 1	
	Tiempo de retención (min)	Contenido (p/p %)
Verprósido	9.545	17.60
Acido verátrico	10.821	0.72
Catalpósido	16.727	2.62
Picrósido II	20.345	1.08

Resultado de HPLC (extracto purificado: ATC1)		
Ingrediente activo	Ejemplo 1	
	Tiempo de retención (min)	Contenido (p/p %)
Isovanilloil-catalpol	21.853	1.26
6-O-veratroil-catalpol	30.462	2.36
Total		25.64

Ejemplo 2. Preparación del extracto purificado (ATC2) de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum*

El extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* según el ejemplo 1, se disolvió en 75 mL de una mezcla de disolventes (agua destilada:metanol= 1:0.003) y 75 g de la solución se cargó sobre una columna de cromatografía en fase reversa (C18(IV)-D-75-120 nm, AGC Si-Tech Co. Ltd., Japón, 450 g) eluyendo la suspensión usando un disolvente de elución (agua destilada:metanol= 90:10 → 60:40). Se recogieron 8.4 L de la solución de elución que sale al inicio del sistema de disolventes de elución (agua destilada:metanol= 90:10) y se concentró bajo presión reducida. Se recogieron 5.6 L de la solución de elución que sale al final del sistema de disolventes de elución (agua destilada:metanol=60:40), se concentró bajo presión reducida y se secó para dar 33 g del extracto purificado de la invención con el segundo fraccionamiento (ATC2) usado como una muestra para ensayo.

El análisis de los componentes se llevó a cabo usando un equipo de HPLC (Agilent modelo 1260, EE.UU.) según las condiciones de la Tabla 1 y el resultado se muestra en el Fig.3.

Como se puede ver en la Fig.3, se confirmó que cada ingrediente se detectó a 9.525 min (verprósido), 10.818 min (ácido verátrico), 16.721 min (Catalpósido), 20.346 min (Picrósido II), 21.857 min (Isovanilloil-catalpol), y 30.462 min (6-O-veratroil-catalpol) respectivamente.

El contenido de cada ingrediente (%) en la muestra se calculó basándose en el perfil de HPLC (tiempo de retención) según la fórmula matemática 1.

Con el resultado, se confirmó que el extracto purificado con el segundo fraccionamiento (ATC2) de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* contenía 65.63 % (p/p) de derivados de catalpósido, es decir, 43.83 % (p/p) de verprósido, 1.80 % (p/p) de ácido verátrico, 7.07 % (p/p) de catalpósido, 2.93 % (p/p) de picrósido II, 3.85 % (p/p) de isovanilloil-catalpol, y 6.15 % (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol, respectivamente, tal como se puede ver en la Tabla 4.

Tabla 4

Resultado de HPLC (extracto purificado: ATC2)		
Ingrediente activo	Ejemplo 2	
	Tiempo de retención (min)	Contenido (p/p %)
Verprósido	9.524	43.83
Acido verátrico	10.818	1.80
Catalpósido	16.721	7.07
Picrósido II	20.346	2.93
Isovanilloil-catalpol	21.857	3.85
6-O-veratroil-catalpol	30.462	6.15
Total		65.63

Ejemplo experimental 1. Determinación preliminar del nivel total de IgE en suero en modelo de ratón sensibilizado con/estimulado con OVA.

5 Con el fin de encontrar el extracto purificado que muestre la actividad farmacológicamente más potente que el extracto bruto preparado en el ejemplo comparativo, el siguiente ensayo preliminar se llevó a cabo según el método descrito en la bibliografía (Elias, J. A. et al., J. Clin. Invest., 111, pp 297-297, 2003).

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

10 Ratones BALB/c hembras libres de patógenos específicos (aproximadamente 20 g), con 6 semanas, que periódicamente fueron chequeados serológicamente para patógenos respiratorios relevantes, se obtuvieron de ORIENT Co. (Seul, Corea) y se aclimataron con el medioambiente experimental durante 1 semana.

15 En resumen, los ratones se sensibilizaron por inyección intraperitoneal de 20 µg de OVA (Ovalbúmina; A5503, Sigma, St. Louis, MO), que se emulsionó en 2 mg de hidróxido de aluminio en 200 µL de tampón PBS (pH 7.4), cada dos semanas. Los ratones fueron estimulados a través de las vías respiratorias con OVA (1% de PBS) durante 30 min usando un nebulizador ultrasónico (NE-U12; Omron Corp., Tokyo, Japón) del día 28 al 34 después de la sensibilización inicial. Después de 24h del tratamiento con antígeno, se determinó la hipersensibilidad de las vías respiratorias y los ratones fueron sacrificados 48h después de la última estimulación. Los ratones fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital (Entobal®, Hanrim Pharm. Co. Ltd.) 24 horas después de la última estimulación, y se llevó a cabo una traqueotomía. Después se instilaron 1.2 mL de solución de suero fisiológico (PBS) en los pulmones, se obtuvo el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) mediante aspiración tres veces (total 20 1.5 mL) vía canulación traqueal.

Los grupos se dividieron en varios grupos, es decir, (a) grupo de control normal (NC): los grupos tratados o no tratados con OVA; (b) grupos inducido al asma (OVA): los grupos tratados con OVA para inducir asma; y (c) grupos comparativos: los grupos tratados con grupo de control positivo (M30, montelukast; 30 mg/kg, PO, Sigma-Aldrich Co. Ltd., SML-0101) 1h antes de la inhalación de OVA.

25 El grupo para ensayo consiste en 6 ratones por cada grupo y 1 h antes de la inhalación de OVA, se administraron oralmente varias concentraciones de la muestra para ensayo, ATC1 (30 mg/kg y 100 mg/kg) y ATM (30 mg/kg y 100 mg/kg) a los ratones.

30 Tal como se muestra en la tabla 5, el nivel total de IgE en suero sanguíneo en el grupo inducido al asma (OVA) aumentó significativamente mientras que para aquellos del grupo de la muestra para ensayo administrados con varias concentraciones de muestras para ensayo (ATC1, 30 mg/kg y 100 mg/kg) fue más reducido que en el grupo tratado con el extracto bruto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* (ATM, 30 y 100 mg/kg). (véase la Tabla 5).

Tabla 5

El nivel total de IgE en suero sanguíneo		
		total de IgE (mg/ml)
NC		0.57±0.02
OVA		5.23±0.34
ATC1	30mg/kg	2.05±0.12
	100mg/kg	2.14±0.25
ATM	30mg/kg	3.09±0.54
	100mg/kg	2.49±0.35
Monte30		1.82±0.40

35 Ejemplo experimental 2. El efecto anti-asmático usando el ensayo de hipersensibilización de las vías respiratorias en un modelo de ratón sensibilizado con/estimulado con OVA.

Con el fin de confirmar el efecto anti-asmático de las muestras para ensayo preparadas en los ejemplos usando el ensayo de hipersensibilización de las vías respiratorias en un modelo de ratón sensibilizado con/estimulado con OVA, el siguiente ensayo se llevó a cabo mediante el método descrito en la bibliografía (Elias, J. A. et al., J. Clin. Invest., 111, pp297-297, 2003).

5 1-1. Sensibilización animal y estimulación de las vías respiratorias

Ratones BALB/c hembras libres de patógenos específicos (aproximadamente 20 g), con 6 semanas, que periódicamente fueron chequeados serológicamente para patógenos respiratorios relevantes, se obtuvieron de ORIENT Co. (Seul, Corea) y se aclimataron con el medioambiente experimental durante 1 semana.

10 En resumen, los ratones se sensibilizaron por inyección intraperitoneal de 20 µg de OVA (Ovalbúmina; A5503, Sigma, St. Louis, MO), que se emulsionó en 2 mg de hidróxido de aluminio en 200 µL de tampón PBS (pH 7.4), cada dos semanas. Los ratones fueron estimulados a través de las vías respiratorias con OVA (1% de PBS) durante 30 min usando un nebulizador ultrasónico (NE-U12; Omron Corp., Tokyo, Japón) del día 28 al 34 después de la sensibilización inicial. Después de 24h del tratamiento con antígeno, se determinó la hipersensibilidad de las vías respiratorias y los ratones fueron sacrificados 48h después de la última estimulación. Los ratones fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital (Entobal, Hanrim Pharm. Co. Ltd.) 24 horas después de la última estimulación, y se llevó a cabo una traqueotomía. Después se instilaron 1.2 mL de solución de suero fisiológico (PBS) en los pulmones, se obtuvo el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) mediante aspiración tres veces (total 1.5 mL) vía canulación traqueal.

20 Se estudió el grupo de ratones (n= 6); recibieron el siguiente tratamiento: (1) el grupo no tratado con OVA como grupo de control normal (NC); (2) el grupo de control tratado e inhalado con OVA como un grupo inducido al asma (OVA); (3) el grupo de control positivo tratado con agentes terapéuticos contra el asma (Montelukast; 30 mg/kg, PO, Sigma-Aldrich Corea, SML-0101, M30) 1 hora antes de la inhalación de OVA; (4) el grupo para ensayo de la muestra administrados oralmente con varias concentraciones de las muestras para ensayo, es decir, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg del extracto purificado (ATC2) 1 hora antes de la inhalación de OVA.

25 1-2. Evaluación de la hipersensibilidad de las vías respiratorias

30 Con el fin de evaluar la hipersensibilidad de las vías respiratorias de los ratones, la resistencia de las vías respiratorias se determinó usando un aparato (pletismografía de cuerpo entero en una cámara, OCP3000, All Medicus, Seul, Corea) y el valor determinado se calculó estadísticamente mediante el valor Penh (Pausa mejorada) que refleja el grado de obstrucción de las vías respiratorias. El valor Penh se determinó durante 3 min siguiendo el procedimiento para determinar el valor basal de la fase eupnea y determinar el valor Penh después de inhalar PBS con el nebulizador ultrasónico (NE-U12, IMRON Corp., Tokyo, JAPON) durante 3 min.

35 Después, se inhalaron varias concentraciones de metacolina (A2251, Sigma, St. Louis, MO), 12, 25 y 50 mg/ml con aumento de la concentración para determinar los valores Penh. El aumento del valor Penh se expresó como porcentaje (%) después de la inhalación de metacolina y el valor Penh de la línea basal se ajustó a 100%. El valor de Pehn se calculó según la fórmula matemática 2 y el resultado se muestra en la Fig.4

[fórmula matemática 2]

$$\text{Pehn} = (\text{Te} / \text{RT} - 1) \times \text{PEF} / \text{PIF}$$

Te: tiempo de expiración (el periodo desde la inhalación hasta la siguiente inhalación);

40 RT: tiempo de relajación (el periodo en el que el volumen extendido alcanza la extensión de hasta 30% de un volumen de expiración durante la expiración)

PEF: flujo de expiración máximo

PIF: flujo de inspiración máximo

45 Con el resultado, se confirmó que el valor Penh en el grupo de control tratado e inhalado con OVA como un grupo inducido al asma (OVA) aumentó considerablemente mientras que el grupo no tratado con OVA como un grupo de control normal (NC) tuvo un incremento gradual con un aumento de la concentración de metacolina.

En breve, el valor Penh en el grupo de control positivo tratado con Montelukast (MO) al igual que el grupo de la muestra para ensayo administrado oralmente con varias concentraciones de las muestras para ensayo (ATC-10, ATC-25, y ATC-50) se redujo significativamente respecto de la concentración de metacolina (Véase la tabla 6).

Tabla 6

Valor Penh		0	12.5	25	50
Metacolina(Conc. mg/ml)		0	12.5	25	50
NC		0.37± 0.03	0.39± 0.04	0.69± 0.14	1.07± 0.18
OVA		0.85± 0.10	2.79± 0.25	5.99± 0.92	7.24± 0.74
ATC2(mg/kg)	5	0.52± 0.05	1.69± 0.27	2.68± 0.52	5.19± 0.74
	10	0.63± 0.06	1.54± 0.18	2.01± 0.52	3.08± 0.40
	25	0.64± 0.08	1.31± 0.17	1.64± 0.31	2.43± 0.33
	50	0.51± 0.06	1.02± 0.17	1.36± 0.09	1.82± 0.28
M30		0.49± 0.04	1.54± 0.20	1.98± 0.37	2.51± 0.36

5 Se confirmó que aquellos cambios en el valor Penh fue notable en el caso del grupo tratado con metacolina a mayores dosis más que en el grupo tratado con metacolina a menores dosis y el valor Penh en la muestra para ensayo para la misma concentración de metacolina, disminuyó considerablemente de manera dependiente de la dosis.

Según esto, se confirmó que el extracto purificado suprimió eficazmente la hipersensibilidad de las vías respiratorias y por ello, son útiles en el tratamiento y prevención de la enfermedad asma, una enfermedad alérgica en las vías respiratorias.

10 Ejemplo experimental 3. Efecto del nivel de eosinófilos y células inflamatorias en BALF

Con el fin de confirmar el efecto de inhibición de las muestras para ensayo preparadas en los ejemplos sobre el nivel de eosinófilos y las células inflamatorias en el fluido broncoalveolar (BALF), el siguiente ensayo se llevó a cabo mediante el método descrito en la bibliografía (Chen M. et al., Immunolgy, pp376-384, 2011).

15 El fluido de lavado broncoalveolar (BALF) preparado en el ejemplo experimental 1 se recuperó para determinar el nivel de células inflamatorias.

20 El número total de células inflamatorias fue evaluado mediante el recuento de células en al menos cinco cuadrados de un hemocitómetro después de excluir las células muertas mediante la tinción con azul de triptano (Daigle I. et al., *Swiss Med Wkly*, **131**, pp 2317, 2001). Se cargaron 100 µL de BALF sobre un porta y se centrifugó (200 × g, 4 °C, 10 min) para fijar las células sobre el porta usando una máquina Cellspin (Cyto12.5 + clip5, Hanil Science Industrial, Corea). Las células se tintaron con reactivos Diff-Quick® Stain (Sysmex, Cat No.38721, Suiza) según las instrucciones del fabricante. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de la t de Student bilateral para medias independientes y el nivel crítico para la significancia se ajustó a $P < 0.05$.

25 Tal como se muestra en la Fig.5, el número total de eosinófilos y células inflamatorias en el grupo de control tratado e inhalado con OVA como un grupo inducido al asma (OVA) aumentó significativamente comparado con aquellos del grupo no tratado con OVA como un grupo de control normal (NC).

El número total de eosinófilos y células inflamatorias en el grupo de control positivo tratado con Montelukast (MO) al igual que el grupo de la muestra para ensayo administrada oralmente con varias concentraciones de las muestras para ensayo (ATC-5, ATC-10, ATC-25, y ATC-50) se redujeron significativamente (véase la Tabla 7).

Tabla 7

número total de eosinófilos y células inflamatorias en BALF		
Nº. de células inflamatorias (10 ³ células/ratón)	Nº. de eosinófilos	Nº. de células inflamatorias
NC	0.00± 0.00	8.28± 1.46

número total de eosinófilos y células inflamatorias en BALF		
Nº. de células inflamatorias (10 ³ células/ratón)	Nº. de eosinófilos	Nº. de células inflamatorias
OVA	135.44± 4.54	260.48± 10.39
ATC2 (mg/kg)	5	72.23± 9.45
	10	55.40± 3.46
	25	40.8± 2.34
	50	36.57± 4.02
M30	52.03± 4.06	106.67± 6.48

Ejemplo experimental 4. Efecto sobre el nivel de IgE e IgE específico de OVA en suero sanguíneo

5 Con el fin de confirmar el efecto de inhibición de las muestras para ensayo preparadas en los ejemplos sobre el nivel de IgE e IgE específico de OVA en suero sanguíneo, el siguiente ensayo se llevó a cabo mediante el método descrito en la bibliografía (Kay, A.B., The New England Journal of Medicine, 344, pp30-37, 2001).

El suero sanguíneo y el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) preparados en el ejemplo experimental 1 se recuperó para determinar el nivel de IgE e IgE específico de OVA en suero sanguíneo.

10 El suero sanguíneo y el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) se añadieron sobre placas de 96 pocillos (placas ELISA) y se recubrieron con una solución tampón de NaHCO₃ 0.1 M (pH 8.3) que contenía 20 µg/ml of OVA (Sigma, MO, EE.UU.) a 4°C durante toda la noche. Después de inhibir la reacción no específica usando PBS que contenía 1% de albúmina de suero bovino, el suero para ensayar se diluyó 1: 400 y se dejaron reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, el suero reaccionó con anticuerpo monoclonal IgE anti-ratón diluido (x300) (MCA419, Serotec, Oxford, GB) durante 2 horas y con anticuerpo policlonal A de cabra anti-IgG de rata conjugado a HRP (peroxidasa de rábano por sus siglas en inglés) (STAR110P, Serotec, GB) diluido (x4000) durante 15 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, la solución se tintó con sustrato 3', 5,5'-tetrametilbenzidina (52-00-02, KPL) y la reacción se paró con H₂SO₄ 2N para determinar la absorbancia usando espectroscopia (Versamax, Molecular Devices, EE.UU.) a 450 nm.

20 Tal como se muestra en las Fig. 6 y Fig. 7, el nivel de IgE e IgE específico de OVA en suero sanguíneo en el grupo de control tratado e inhalado con OVA como un grupo inducido al asma (OVA) aumentó significativamente mientras que aquellos en el grupo de control positivo tratado con Montelukast (MO) al igual que el grupo de la muestra para ensayo administrada oralmente con varias concentraciones de las muestras a ensayar (ATC-5, ATC-10, ATC-25, y ATC-50) fueron reducidos significativamente (véase la Tabla 8).

Tabla 8

el nivel de IgE e IgE específico de OVA en suero sanguíneo		
Concentración (µg/ml)	Nivel de IgE en suero	Nivel de IgE específico de OVA
NC	0.92± 0.17	0.05± 0.00
OVA	7.68± 0.42	0.17± 0.02
ATC2 (mg/kg)	5	6.51± 0.72
	10	4.97± 0.91
	25	4.56± 0.73
	50	4.01± 0.67
M30	4.76± 0.73	0.09± 0.02

Según esto, se confirmó que el extracto purificado inhibió el nivel de IgE e IgE específico de OVA en suero sanguíneo y por lo tanto, son útiles para el tratamiento y prevención de la enfermedad alérgica y enfermedad de asma.

5 Ejemplo experimental 5. Efecto sobre el nivel de citoquinas inflamatorias en BALF

Con el fin de confirmar el efecto de inhibición de las muestras para ensayo preparadas en los ejemplos sobre el nivel de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 y IL-13) e IL-1 β sobre el fluido de lavado broncoalveolar (BALF), el siguiente ensayo se llevó a cabo mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima de tipo sándwich descrito en la bibliografía (Renz H. et al., J. Exp. Med., 1777, pp1175-1180, 1993).

10 El suero sanguíneo y el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) se añadieron sobre placas de 96 pocillos (placas ELISA) y se recubrieron con anticuerpo citoquina para inducir la reacción antígeno-anticuerpo durante 2 horas a temperatura ambiente. Se determinó el nivel de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 y IL-13) e IL-1 β en el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) usando un kit ELISA (Int. CA, EE.UU.) que reacciona especialmente con cada citoquina según el manual del fabricante.

15 Tal como se muestra en las Fig. 8 y Fig.9~11, 48 horas después del tratamiento con OVA, el nivel de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 y IL-13) e IL-1 β en el grupo de control tratado e inhalado con OVA como un grupo inducido a asma (OVA) aumentó significativamente comparado con aquellos del grupo de no tratados con OVA como un grupo de control normal (NC).

20 El nivel superior de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 y IL-13) e IL-1 β en el grupo de control positivo tratado con Montelukast (MO, 30 mg/kg) al igual que el grupo de la muestra para ensayo administrada con varias concentraciones de muestras para ensayo (ATC-10, ATC-25, y ATC-50) fueron reducidos significativamente. (véase Tabla 9).

Tabla 9

El nivel de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 y IL-13) e IL-1 β					
conc. (pg/ml)		IL-1 β	IL-4	IL-5	IL-13
NC		94.12 \pm 65.24	20.94 \pm 1.76	57.51 \pm 3.15	22.25 \pm 3.04
OVA		281.78 \pm 26.15	48.76 \pm 6.96	109.48 \pm 2.87	44.76 \pm 4.85
ATC2(m g/kg)	5	243.93 \pm 27.58	35.27 \pm 5.26	90.77 \pm 12.78	34.29 \pm 7.55
	10	226.33 \pm 14.21	35.18 \pm 4.45	79.26 \pm 9.60	29.50 \pm 2.76
	25	190.30 \pm 17.82	29.94 \pm 2.32	73.74 \pm 9.54	27.27 \pm 4.42
	50	170.70 \pm 25.43	25.26 \pm 5.55	57.92 \pm 19.99	23.53 \pm 4.10
M30		187.03 \pm 47.17	32.60 \pm 4.53	69.74 \pm 7.17	25.93 \pm 4.13

25 Según esto, se confirmó que el extracto purificado inhibió eficazmente el nivel de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 y IL-13) e IL-1 β en BALF y por lo tanto, son útiles en el tratamiento o prevención de la enfermedad alérgica y enfermedad de asma.

Ejemplo experimental 6. Histología de pulmón

30 Con el fin de confirmar el efecto anti-asmático de las muestras para ensayo preparadas en los ejemplos, el siguiente análisis histopatológico del tejido broncoalveolar se llevó a cabo mediante el método descrito en la bibliografía (Kwak YG. et al., J. Clin. Invest., 111, pp 1083-1092, 2003).

35 El tejido de pulmón proporcionado de ratones BALB/c a los que no se les ha practicado el lavado broncoalveolar se fijó durante 24h en tampón neutro de formalina al 10%. Después de estar embebidos en parafina, se cortaron luego en secciones de grosor 4, el tejido se tintó con una solución H&E (hematoxilina; Sigma MHS-16 y eosina, Sigma HT110-I-32) y se determinó la puntuación de la inflamación de las cinco regiones en cada sección elegida de manera aleatoria, (puntuación de la inflamación 0: no se encuentran células inflamadas en el entorno bronquial, puntuación de la inflamación 1: se encuentran esporádicamente células inflamadas en el entorno bronquial,

puntuación de la inflamación 2: se encuentra una capa fina de células inflamadas en la mayoría del entorno bronquial, puntuación de la inflamación 3: se encuentra una capa gruesa de células inflamadas en la mayoría del entorno bronquial).

5 Tal como se muestra en las Fig. 12, 13 se encontraron muchas células inflamatorias incluidos eosinófilos en el entorno bronquial e hiperplasia de las células epiteliales al igual que también se encontró hipertrofia del músculo traqueal en el grupo de control tratado e inhalado con OVA como un grupo inducido al asma (OVA) mientras la invasión de las células inflamadas se redujo significativamente en el grupo de control positivo tratado con Montelukast (MO, 30 mg/kg) al igual que el grupo de la muestra para ensayo administrada oralmente con varias concentraciones de muestras para ensayo (ATC-10, ATC-25, y ATC-50). (véase Tabla 10).

10 Tabla 10

Puntuación de la inflamación y la relación de las células caliciformes en células epiteliales bronquiales			
Análisis histopatológico		Puntuación de la inflamación	PAS+células/bronquial (%)
NC		0.06± 0.05	2.19± 0.54
OVA		2.11± 0.07	52.75± 1.42
ATC2 (mg/kg)	5	1.75± 0.17	48.07± 1.15
	10	1.33± 0.14	44.59± 1.60
	25	1.17± 0.11	38.61± 1.74
	50	1.08± 0.18	35.71± 1.14
M30		1.25± 0.13	39.21± 2.34

Ejemplo experimental 7. Evaluación de plasia de células caliciformes

15 Con el fin de confirmar el efecto anti-asmático de las muestras para ensayo preparadas en los ejemplos, el siguiente análisis de la plasia de células caliciformes del tejido broncoalveolar se llevó a cabo mediante el método descrito en la bibliografía (Lee KS. et al., FASEB J., 20, pp455-465, 2006).

El tejido de pulmón proporcionado de ratones BALB/c a los que no se les ha practicado el lavado broncoalveolar se fijó durante 24h en tampón neutro de formalina al 10%. Después de estar embebidos en parafina, se cortaron luego en secciones de grosor 4, el tejido se tintó con ácido peryódico de Schiff (kit de tinción de PAS, T-K7308, IMEB, CA, EE.UU.) para determinar la relación de las células caliciformes en las células epiteliales bronquiales.

20 Tal como se muestra en las Fig. 14, 15 la relación células caliciformes en las células epiteliales bronquiales aumentó significativamente en el grupo de control tratado e inhalado con OVA como un grupo inducido al asma (OVA) comparado con el grupo de control normal (NC) mientras la relación de células caliciformes en las células epiteliales bronquiales se redujo significativamente en el grupo de control positivo tratado con Montelukast (MO, 30 mg/kg) al igual que el grupo de la muestra para ensayo administrada oralmente con varias concentraciones de muestras para ensayo (ATC-10, ATC-25, y ATC-50). (véase Tabla 9).

Ejemplo experimental 8. Toxicidad aguda de la administración oral en rata

El ensayo de toxicidad aguda se llevó a cabo mediante la administración del extracto de la invención a ratas Sprague-Dawley SPF de 6 semanas.

30 Se administraron oralmente 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg, 5000 mg/kg del extracto a cada grupo que consistía en 2 ratas y los síntomas de las ratas se observaron durante 14 días. Después de la administración del extracto, se observaron todos los cambios clínicos es decir, mortalidad, signos clínicos, cambios en el peso corporal y se llevaron a cabo análisis sanguíneos tal como una prueba hematológica y bioquímica hematológica. Se observaron los cambios anormales de los órganos abdominales y órganos torácicos después de la autopsia.

35 No mostraron ningún cambio en mortalidad, signos clínicos, cambios en el peso corporal y resultados macroscópicos en cualquier grupo o cualquier género. Además, no mostraron ninguna toxicidad en el grupo para ensayo tratado con 5000 mg/kg del extracto de la invención.

Según esto, se confirmó que el extracto era potente y una sustancia segura que muestra una DL₅₀ (más de 5000 mg/kg) en administración oral.

Modo de la invención tal como se define en las reivindicaciones

- 5 De ahora en adelante, se van a describir los métodos de formulación y tipos de excipientes, pero la presente invención tal como se define en las reivindicaciones no está limitada a estos. Los ejemplos representativos se describen a continuación.

Preparación de una inyección

Extracto ATC1	100mg
Metabisulfito de sodio	3.0mg
Metil-parabeno	0.8mg
Propil-parabeno	0.1mg
Agua destilada para inyección	Cantidad óptima

- 10 La preparación de la inyección se preparó disolviendo el componente activo, control del pH a aproximadamente 7.5 y luego rellenando con todos los componentes en 2 ml de muestra y esterilizando mediante métodos convencionales de preparación de inyecciones.

Preparación de un polvo

Extracto ATC2	500mg
Almidón de maíz	100mg
Lactosa	100mg
Talco	10mg

La preparación de un polvo se preparó mezclando los componentes anteriores y rellenando el envase sellado.

Extracto ATC1	200mg
Almidón de maíz	100mg
Lactosa	100mg
Estearato de magnesio	Cantidad óptima

15

La preparación del comprimido se preparó mezclando los componentes anteriores y comprimiéndolos.

Extracto ATC2	100mg
Lactosa	50mg
Almidón de maíz	50mg
Talco	2mg
Cantidad óptima	Cantidad óptima

La preparación del comprimido se preparó mezclando los componentes anteriores y rellenando una cápsula de gelatina mediante métodos convencionales de preparación de gelatinas.

ES 2 719 265 T3

Extracto ATC1	1000mg
Azúcar	20g
Polisacárido	20g
Aroma limón	20g

La preparación líquida se preparó disolviendo el componente activo, y luego rellenando todos los componentes en 1000 ml de muestra y esterilizando mediante métodos convencionales de preparación de líquidos.

Extracto ATC2	1000mg
Mezcla de Vitaminas	Cantidad óptima
Vitamina A acetato	70g
Vitamina E	1.0mg
Vitamina B ₁	0.13mg
Vitamina B ₂	0.15mg
Vitamina B ₆	0.5mg
Vitamina B ₁₂	0.2g
Vitamina C	10mg
Biotina	10g
Ácido amido-nicotínico	1.7mg
Acido fólico	50g
Acido pantoténico de calcio	0.5mg
Mezcla Mineral	Cantidad óptima
Sulfato ferroso	1.75mg
Óxido de cinc	0.82mg
Carbonato de magnesio	25.3mg
Fosfato de monopotasio	15mg
Fosfato de dicalcio	55mg
Citrato de potasio	90mg
Carbonato de calcio	100mg
Cloruro de magnesio	24.8mg

Las vitaminas y la mezcla mineral mencionadas anteriormente pueden variar de muchas maneras

Extracto ATC1	1000mg
Ácido cítrico	1000mg
oligosacárido	100g

ES 2 719 265 T3

Concentración de albaricoque	2g
Taurina	1g
Agua destilada	900ml

La preparación de una bebida natural se preparó disolviendo el componente activo, mezclando, y se agitó a 85°C durante 1h, se filtró y luego se rellenó con todos los componentes en 1000 ml de muestra y se esterilizó mediante métodos convencionales de preparación de bebidas naturales.

5 Aplicabilidad industrial

Tal como se describe en este texto, la presente invención tal como se define en las reivindicaciones, proporciona un método industrializado nuevo de la invención para preparar un extracto purificado que contiene ingredientes activos más abundantes como derivados de catalpol del extracto de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* y el extracto purificado mostró una actividad antiinflamatoria, anti-alérgica y anti-asma más potente que el preparado mediante métodos convencionales de preparación descritos en la técnica anterior siguiendo varios ensayos *in vivo* como el ensayo de inhibición sobre la reproducción de eosinófilos, la liberación de inmunoglobulina y citoquinas inflamatorias en plasma y fluido broncoalveolar al igual que la supresión de la hipersensibilidad de las vías respiratorias y la hiperplasia de las células caliciformes en un modelo de ratón OVA-sensibilizado/estimulado con. Así pues, se puede usar como agente terapéutico o alimento natural funcional y prevenir una enfermedad inflamatoria, alérgica o asmática.

REIVINDICACIONES

1. Un extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*, preparado mediante el método: añadir etanol al 30-80% a *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* deshidratado y someter a una extracción con agua fría, a la temperatura que va de 10 a 60°C, durante un periodo que va de 6 horas a 48 horas; posteriormente, someter a extracción a reflujo con agua caliente, a la temperatura que va de 40 a 120°C, durante un periodo que va de 6 horas a 48 horas, para dar el primer extracto en la primera etapa; suspender el primer extracto en aproximadamente 1-5 veces en volumen (v/v) de agua, añadirle 1-10 veces en volumen (v/v) de butanol, fraccionar entre una fase de agua y una fase de butanol y recoger la fase de butanol para dar el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) que contiene 15 - 50 % (p/p) de verprósido, 0.3 - 10 % (p/p) de ácido verátrico, 0.5 - 10 % (p/p) de catalpósido, 0.3 - 10 % (p/p) de picrósido II, 0.3 - 10 % (p/p) de isovanilloil-catalpol y 0.5 - 10 % (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol basado en peso total del extracto (100 %) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.
2. Un extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*, preparado mediante el método: añadir etanol al 30-80% de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* deshidratado y someter a una extracción con agua fría, a la temperatura que va de 10 a 60°C, durante un periodo que va de 6 horas a 48 horas; posteriormente, someter a extracción a reflujo con agua caliente, a la temperatura que va de 40 a 120°C, durante un periodo que va de 6 horas a 48 horas, para dar el primer extracto en la primera etapa; suspender el primer extracto en aproximadamente 1-5 veces en volumen (v/v) de agua, añadirle 1-10 veces en volumen (v/v) de butanol, fraccionar entre una fase de agua y una fase de butanol y recoger la fase de butanol para dar el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) que contiene 12.3-47% (p/p) de derivados de catalpol seleccionados entre el grupo que consiste en verprósido, catalpósido, picrósido II, isovanilloil-catalpol y 6-O-veratroil-catalpol en el extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* y que muestra la relación de la mezcla relativa (p/p) entre el peso de cada derivado de catalpol, de 15.0 - 18.0 (p/p) de verprósido, 2.10 - 2.60 (p/p) de catalpósido, 1 % (p/p) de picrósido II, 1.00 - 1.30 (p/p) de isovanilloil-catalpol y 2.00 - 2.30 (p/p) de 6-O-veratroil-catalpol.
3. Una composición farmacéutica que comprende un extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) como se ha expuesto en la reivindicación 1 ó 2 aislado de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* como un ingrediente activo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, para uso en el tratamiento y prevención de una enfermedad inflamatoria seleccionada entre eczema, dermatitis atópica, conjuntivitis, enfermedad periodontal, rinitis, otitis media, laringofaringitis, amigdalitis, neumonía, úlcera gástrica, gastritis, enfermedad de Crohn, colitis, hemorroide, gota, espondilitis anquilosante, fiebre reumática, lupus sistémico eritematoso, fibromialgia, artritis psoriática, osteoartritis, artritis reumática, periartrosis del hombro, tendinitis, tenosinovitis, peritendinitis, miositis, hepatitis, cistitis, nefritis, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria crónica, o enfermedad inflamatoria aguda; enfermedad alérgica seleccionada entre rinitis alérgica, asma, dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticarias, alergia alimentaria, o alergia a los fármacos; o enfermedad asmática seleccionada entre cualquier asma provocado por varios factores externos seleccionados ácaros del polvo, piel o caspa de animales, cucarachas, alimentos, fármacos, tos, humo de cigarro, contaminación del aire, aditivos alimentarios, actividad física como ejercicio, cambios climáticos, arena amarilla o estrés.
5. Un alimento natural funcional que comprende un extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) como se ha expuesto en la reivindicación 1 ó 2 aislado de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.
6. El alimento natural funcional de la reivindicación 5, para uso en la prevención o alivio de una enfermedad seleccionada entre eczema, dermatitis atópica, conjuntivitis, enfermedad periodontal, rinitis, otitis media, laringofaringitis, amigdalitis, neumonía, úlcera gástrica, gastritis, enfermedad de Crohn, colitis, hemorroide, gota, espondilitis anquilosante, fiebre reumática, lupus sistémico eritematoso, fibromialgia, artritis psoriática, osteoartritis, artritis reumática, periartrosis del hombro, tendinitis, tenosinovitis, peritendinitis, miositis, hepatitis, cistitis, nefritis, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria crónica, o enfermedad inflamatoria aguda; enfermedad alérgica seleccionada entre rinitis alérgica, asma, dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticarias, alergia alimentaria, o alergia a los fármacos; o enfermedad asmática seleccionada entre cualquier asma provocado por varios factores externos seleccionados entre ácaros del polvo, piel o caspa de animales, cucarachas, alimentos, fármaco, tos, humo de cigarro, contaminación del aire, aditivos alimentarios, actividad física como ejercicio, cambios climáticos, arena amarilla o estrés.
7. El extracto purificado que contiene el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) como se ha expuesto en la reivindicación 1 ó 2, aislado de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria seleccionada entre eczema, dermatitis atópica, conjuntivitis, enfermedad periodontal, rinitis, otitis media, laringofaringitis, amigdalitis, neumonía, úlcera gástrica, gastritis, enfermedad de Crohn, colitis, hemorroide, gota, espondilitis anquilosante, fiebre reumática, lupus sistémico eritematoso, fibromialgia, artritis psoriática, osteoartritis, artritis reumática, periartrosis del hombro, tendinitis, tenosinovitis, peritendinitis, miositis, hepatitis, cistitis, nefritis, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria crónica, o enfermedad inflamatoria aguda; enfermedad alérgica seleccionada entre rinitis alérgica, asma,

dermatitis alérgica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticarias, alergia alimentaria, o alergia a los fármacos; o enfermedad asmática seleccionada entre cualquier asma provocado por varios factores externos seleccionados entre ácaros del polvo, piel o caspa de animales, cucarachas, alimentos, fármacos, tos, humo de cigarro, contaminación del aire, aditivos alimentarios, actividad física como ejercicio, cambios climáticos, arena amarilla o estrés.

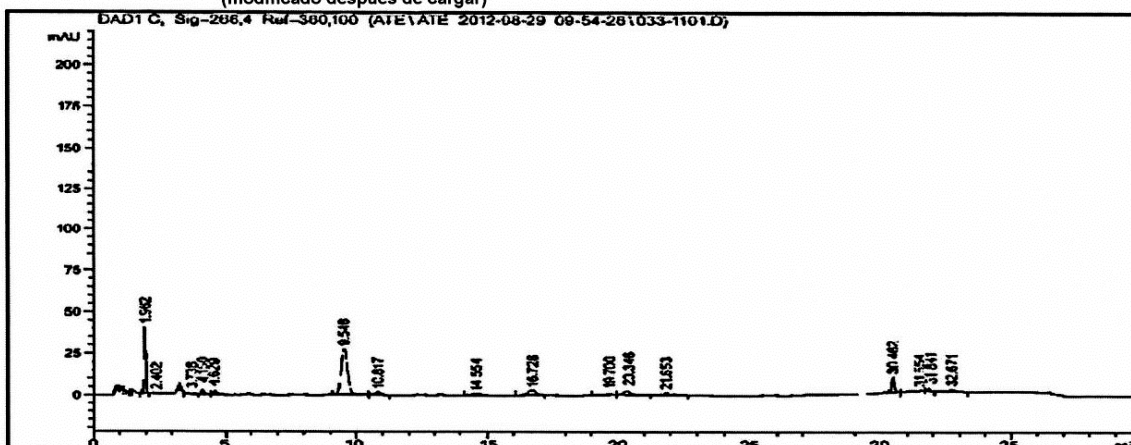
5

[Fig. 1]

Data File C:\CHEM32\1\DATA\ATE\ATE 2012-08-29 09-54-26\033-1101.D
 Nombre Muestra: Lot 018 (Total Ex.)

```

-----
Operador adq.      : admin                      Linea sec. : 11
Instrumento adq.   : HPLC-ELSD                          Posición  : Vial 33
Fecha de inyección : 29/08/2012 5:33:26 PM                       Iny.      : 1
                                                    Volumen de iny. : 10.000 ul
Método adq.       : C:\CHEM32\1\DATA\ATE\ATE        2012-08-29 09-54-26\ATE.M
Ultimo cambio     : 29/08/2012 5:25:47 PM por admin
Método de análisis : C:\CHEM32\1\DATA\ATE\ATE        2012-08-29 09-54-26\ATE.M (Método
                    Secuencia)
Ultimo cambio     : 30/08/2012 12:45:44 PM por admin
                    (modificado después de cargar)
    
```

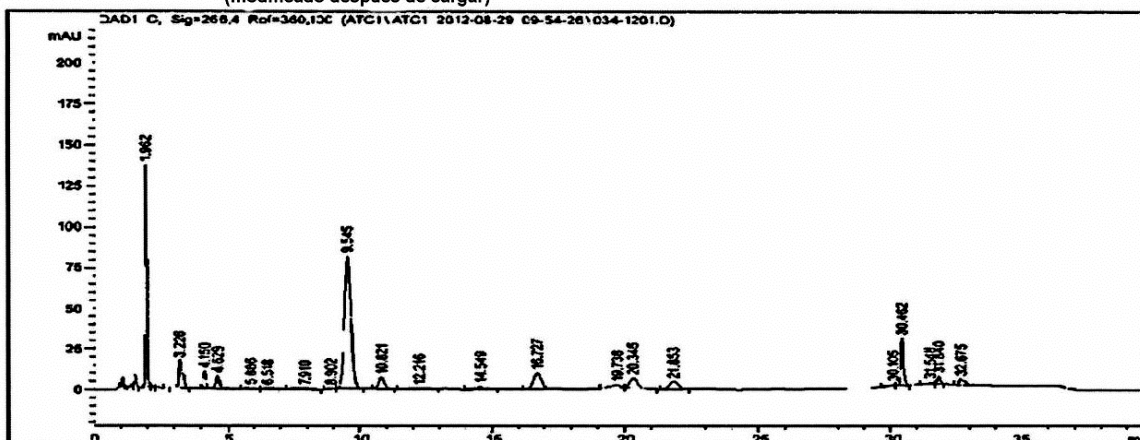


[Fig. 2]

Data File C:\CHEM32\1\DATA\ATC1\ATC1 2012-08-29 09-54-26\034-1201.D
 Nombre Muestra Lot 018 (BuOH Fr.)

```

-----
Operador adq.      : 1 admin                      Linea sec. : 12
Instrumento adq.   : HPLC-ELSD                          Posición  : Vial 34
Fecha de inyección : 29/08/2012 6:14:58 PM                       Iny.      : 1
                                                    Volumen de iny. : 10.000 ul
Método de adq.    : C:\CHEM32\1\DATA\ATC1\ATC1        2012-08-29 09-54-26\ATC1.M
Ultimo cambio     : 29/08/2012 5:25:47 PM por admin
Método de análisis : C:\CHEM32\1\DATA\ATC1\ATC1        2012-08-29 09-54-26\ATC1.M (Método
                    Secuencia)
Ultimo cambio     : 30/08/2012 12:45:44 PM por admin
                    (modificado después de cargar)
    
```



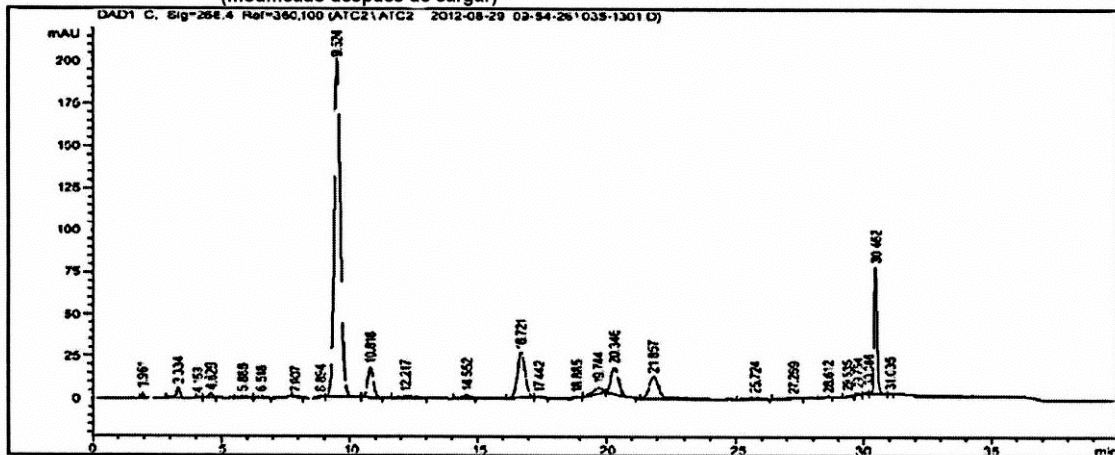
[Fig. 3]

Data File C:\CHEM32\1\DATA\ATC2\ATC2 2012-08-29 09:54:26\035-1301.D
 Nombre Muestra: Lot 018 (ATC2)

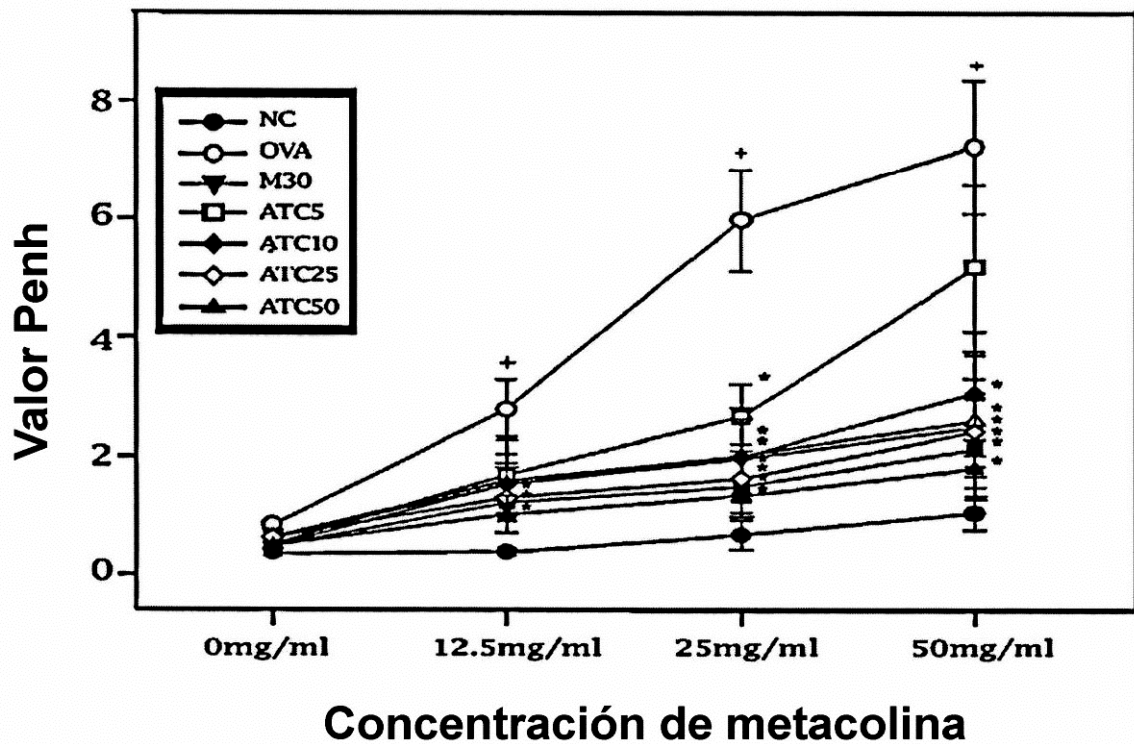
Operador adq. : admin Linea sec. : 13
 Instrumento adq. : HPLC-ELSD Posición : Vial 35
 Fecha de inyección : 29/08/2012 6:56:34 PM Iny. : 1
 Volumen de iny. : 10.000 ul

Método de adq. : C:\CHEM32\1\DATA\ATC2\ATC2 2012-08-29 09:54:26\ATC2.M
 Último cambio : 29/08/2012 5:25:47 PM por admin
 Método de análisis : C:\CHEM32\1\DATA\ATC2\ATC2 2012-08-29 09:54:26\ATC2.M (Método Secuencia)

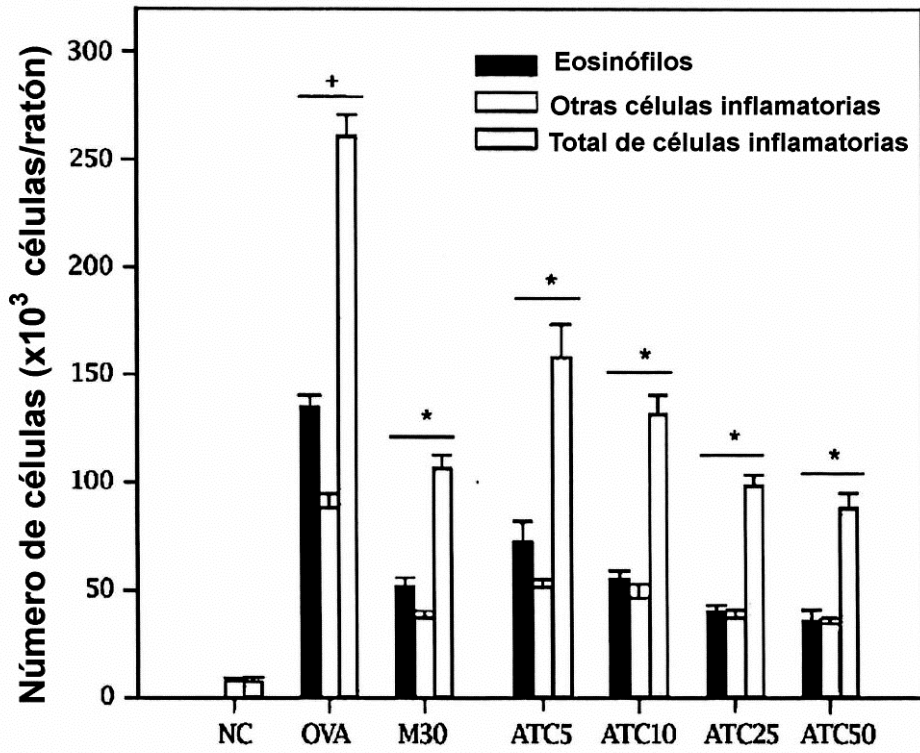
Último cambio : 30/08/2012 12:45:44 PM por admin (modificado después de cargar)



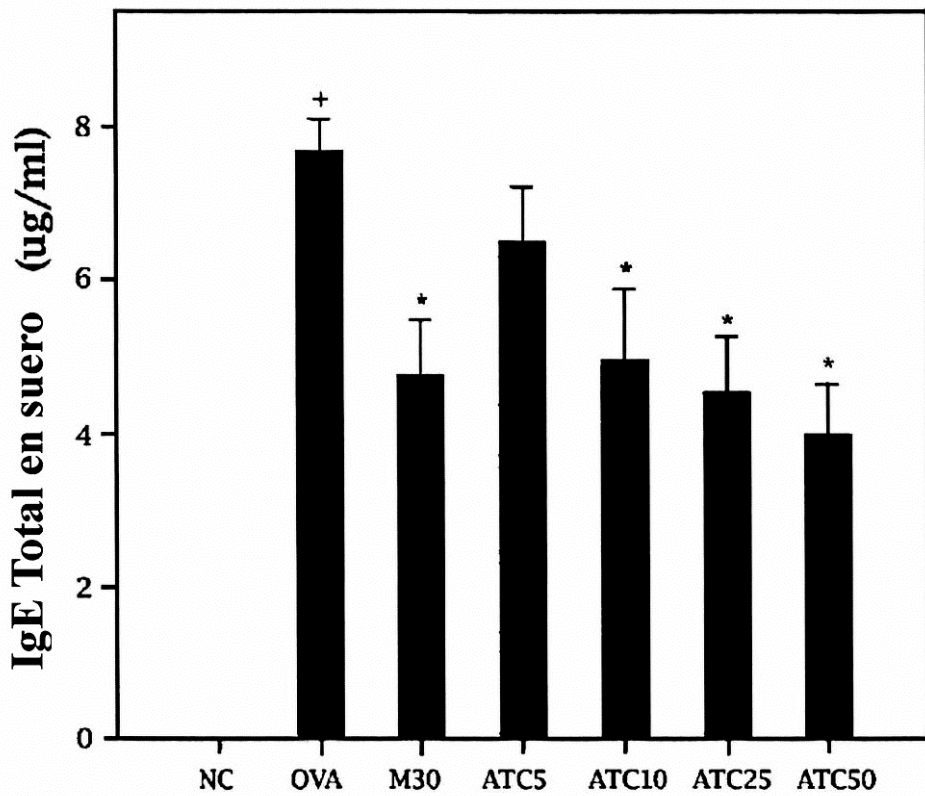
[Fig. 4]



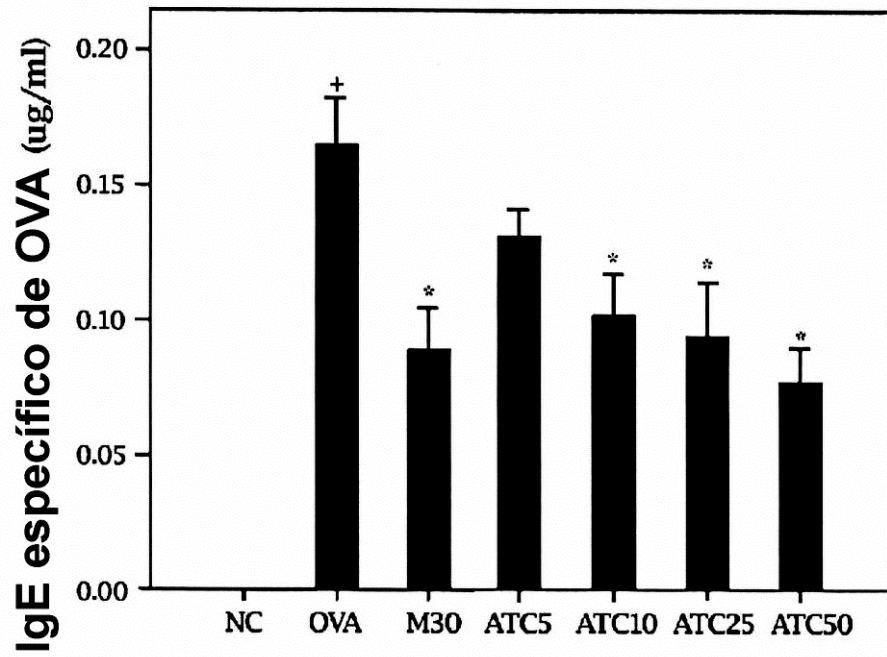
[Fig. 5]



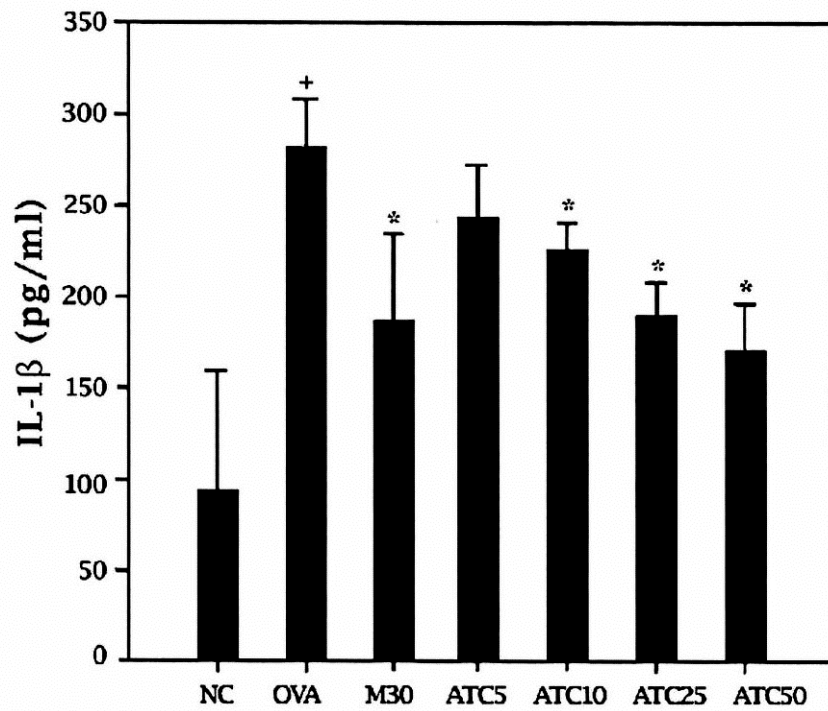
[Fig. 6]



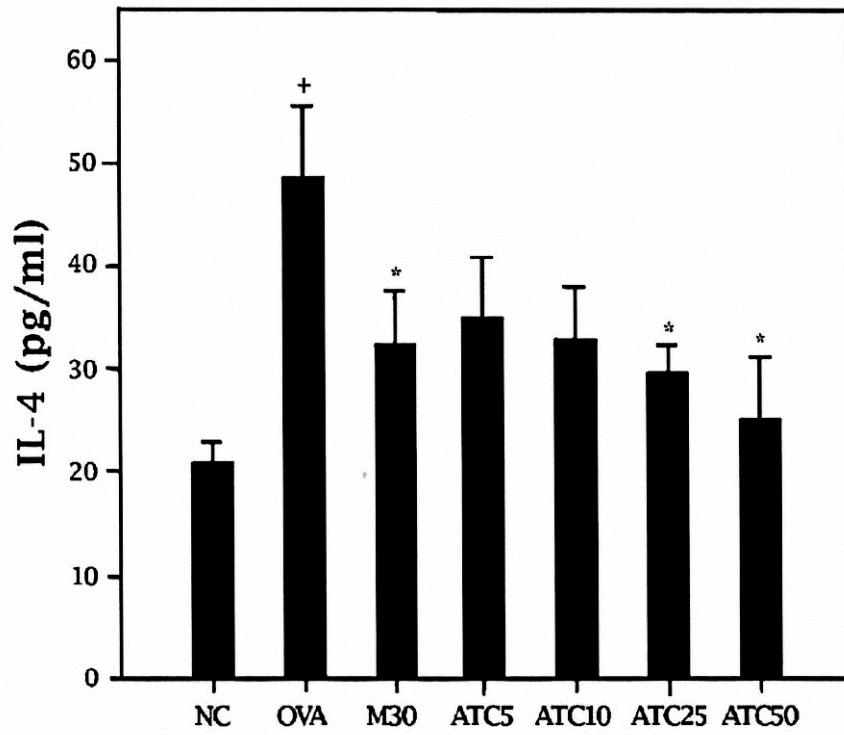
[Fig. 7]



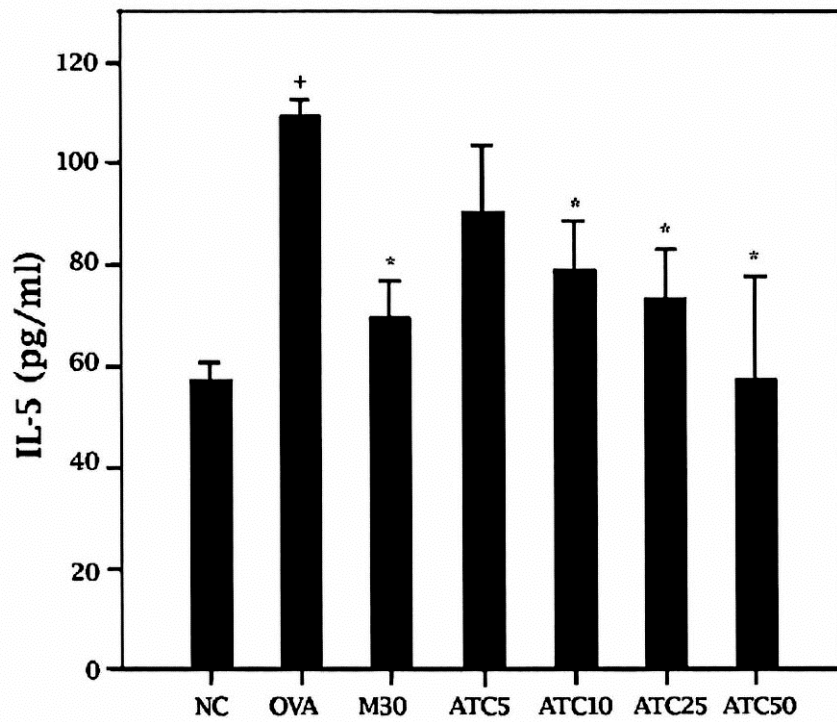
[Fig. 8]



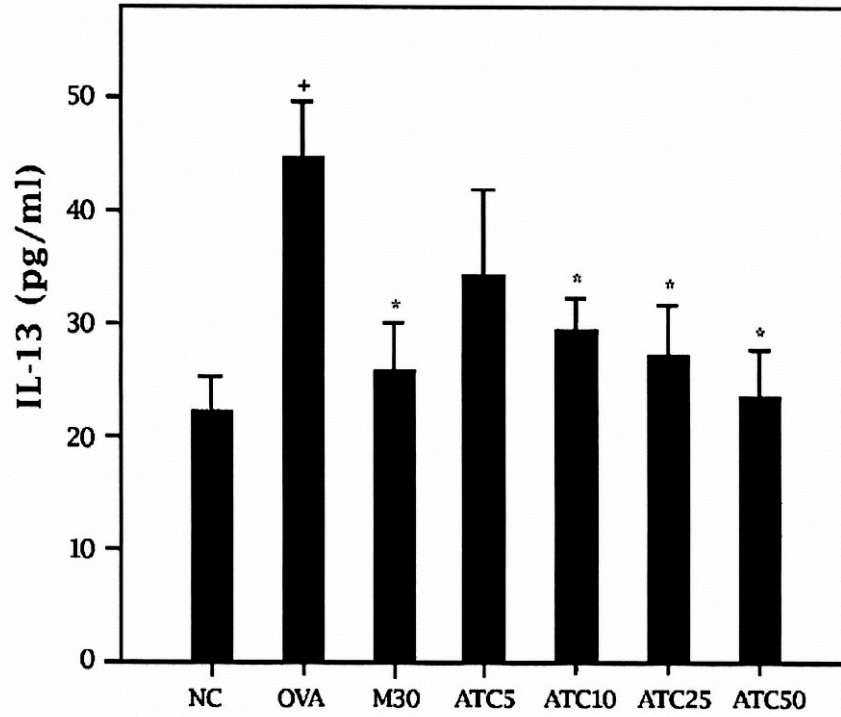
[Fig. 9]



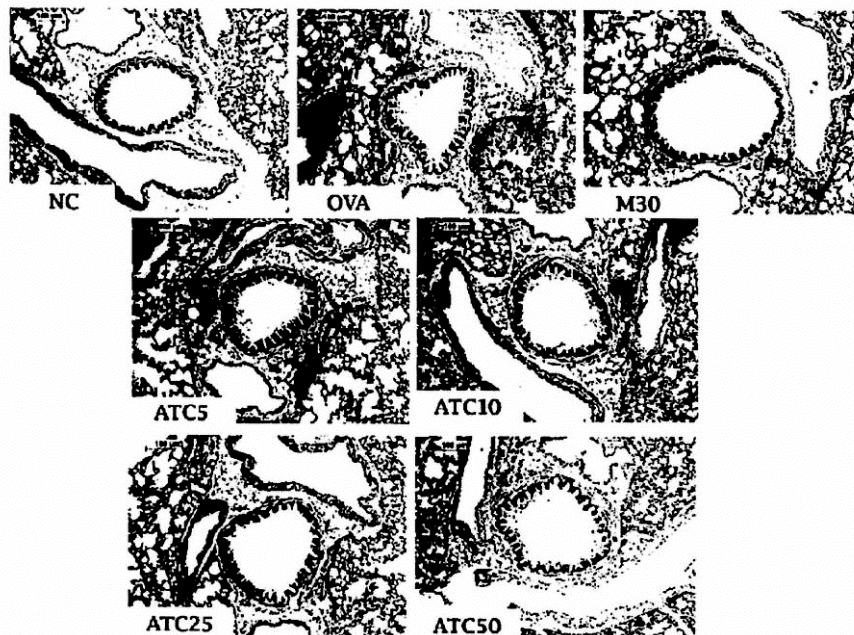
[Fig. 10]



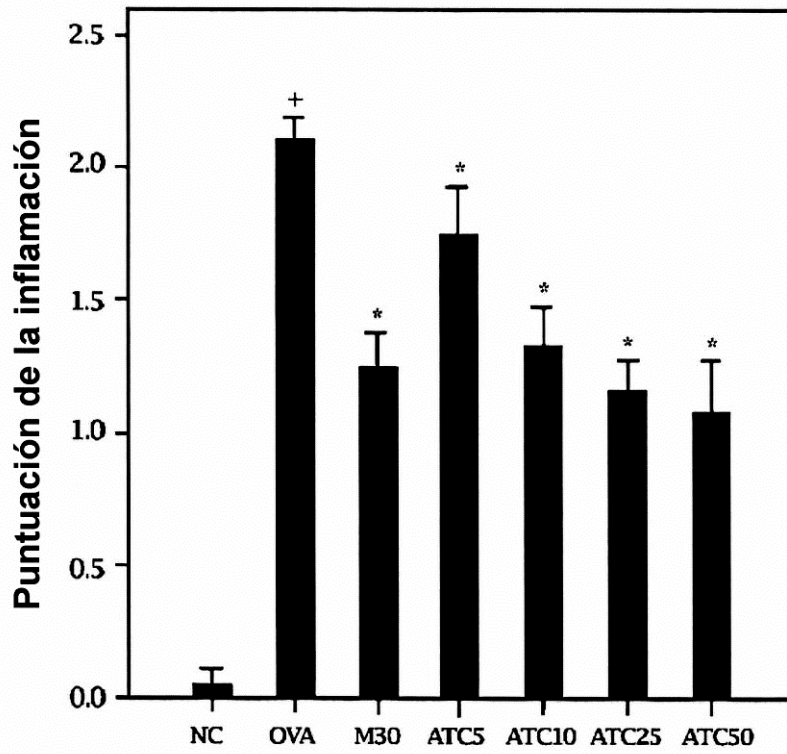
[Fig. 11]



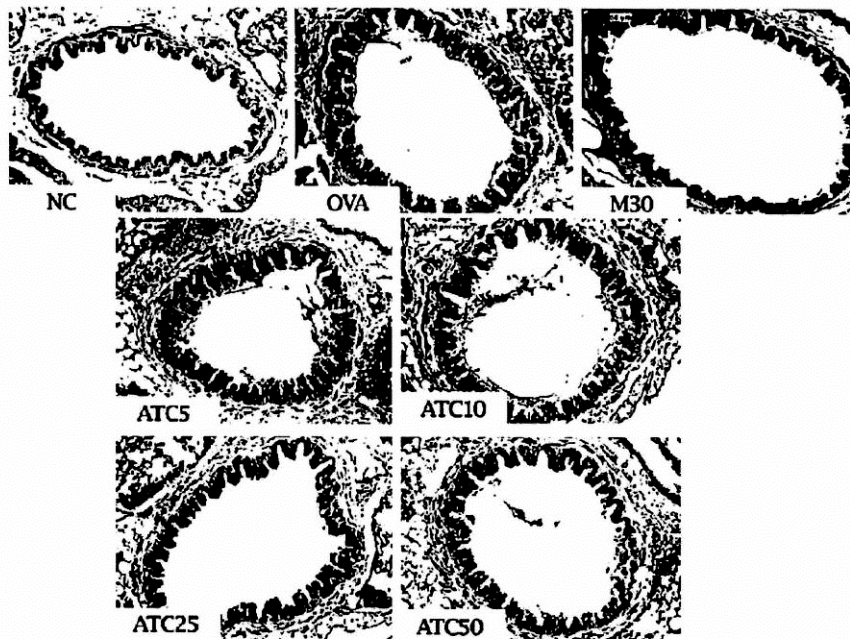
[Fig. 12]



[Fig. 13]



[Fig. 14]



[Fig. 15]

