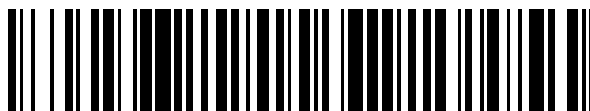


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 548**

51 Int. Cl.:

A61K 36/80 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)
A23L 33/10 (2006.01)
A61K 31/194 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A23L 33/105 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2014** **PCT/KR2014/003080**
87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014** **WO14168413**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2014** **E 14782160 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019** **EP 3019182**

54 Título: **Composición que comprende un extracto purificado aislado de Pseudolysimachion rotundum var. subintegrum que contiene una abundante cantidad de ingrediente activo, o sus compuestos aislados, como un ingrediente activo para prevenir o tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y su uso**

30 Prioridad:

10.04.2013 KR 20130039458
27.03.2014 KR 20140036245

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2019

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;
AHN, KYUNG SEOP;
OH, SEI RYANG;
LEE, HYEONG KYU;
SHIN, IN SIK;
KIM, DOO YOUNG;
KWON, OK-KYOUNG;
SONG, HYUK HWAN;
KIM, SEUNG HYUNG y
LEE, SUUI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 728 548 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende un extracto purificado aislado de *Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum* que contiene una abundante cantidad de ingrediente activo, o sus compuestos aislados, como un ingrediente activo para prevenir o tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y su uso

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC) y a un alimento funcional para la salud para su uso en el alivio de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Técnica de la invención

10 En general, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una enfermedad pulmonar causada por una enfermedad inflamatoria anormal en el pulmón consecuencia de la obstrucción de las vías respiratorias. La EPOC da lugar a disneas que son provocadas por la obstrucción de un extenuante paso de aire y muestra diferentes características, por ejemplo, una precaria reversibilidad de la limitación de las vías respiratorias o la obstrucción de las vías respiratorias, el desarrollo progresivo según el tiempo transcurrido, etc., respecto a las características
15 comunes del asma, y se pueden clasificar en enfisema pulmonar y bronquitis obstructiva crónica (Barnes P.J. 20014, Mediators of chronic obstructive pulmonary disease, Pharmacol. Rev. 56:515-548).

Se ha demostrado que la EPOC es uno de los factores de riesgo de la morbilidad y la mortalidad cardiovascular y era la quinta causa principal de muerte en todo el mundo en el 2001. La prevalencia de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica según los criterios de la iniciativa global para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (GOLD, por sus siglas en inglés) (una proporción de FEV1 frente a FVC de menos de 0,7) fue del 17,2% (hombres, 25,8%;
20 mujeres, 9,6%) entre los coreanos mayores de 45 años (Dong Soon Kim, Young Sam Kim, Ki-Suck Jung, Jung Hyun Chang, Chae-Man Lim, Jae Ho Lee, Soo-Taek UH, Jae Jeong Shim, y Woo Jin Lew, en nombre de la Academia coreana de la tuberculosis y las enfermedades respiratorias, AM J Respir Crit Care Med, Vol 172. pp. 842-847, 2005; Don D. Sin y S.F. Paul Man, Chronic Obstructive Pulmonary Disease as a Risk Factor for Cardiovascular
25 Morbidity and Mortality, Proc Am Thorac Soc Vol 2., pp. 8-11, 2005; A Sonia Buist, Mary Ann McBurnie, William M Vollmer, Suzanne Gillespie, Peter Burney, David M Mannino, Ana M B Menezes, Sean D Sullivan, Todd A Lee, Kevin B Weiss, Robert L Jensen, Guy B Marks, Amund Gulsvik, Ewa Nizankowska-Mogilnicka, International variation in the prevalence of COPD (The BOLD Study): a population-based prevalence study, Vol 370; 741-750, septiembre 1, 2007).

30 La mayoría de los pacientes con EPOC tiene los tres mecanismos patológicos (bronquitis obstructiva crónica, enfisema y obstrucción por mucosidad) ya que todos son inducidos por el tabaquismo, pero pueden diferir en la proporción que tienen respecto a los enfisemas y las bronquitis obstructivas. En los países desarrollados, el tabaquismo es, con diferencia, la causa más común de la EPOC, pero existen otros factores de riesgo, como la contaminación atmosférica (en particular, la contaminación del aire en interiores por la quema de combustibles), la mala alimentación y la exposición profesional. La EPOC se caracteriza por una aceleración del declive normal de la función pulmonar observado con la edad. La limitación progresiva del flujo de aire conduce a la discapacidad y a la muerte prematura y es muy diferente de la obstrucción variable de las vías respiratorias y los síntomas del asma, que, rara vez, avanzan en su gravedad.

Se ha demostrado de que la acción fisiopatológica y el síndrome de la EPOC son fundamentalmente diferentes de los del asma. Aunque la EPOC y el asma implican una inflamación en el tracto respiratorio, existen marcadas diferencias en la naturaleza del proceso inflamatorio como, por ejemplo, en las células inflamatorias, los mediadores, la respuesta frente a la inflamación, la distribución anatómica y las respuestas de acuerdo con la terapia antiinflamatoria aplicada, por ejemplo, (a) con respecto a las células inflamatorias, los mastocitos, eosinófilos, células D4+ (Th2), macrófagos, etc., actúan principalmente en la aparición del asma, mientras que los neutrófilos, CD8+
45 (TC), etc. actúan principalmente en la aparición de la EPOC; (b) con respecto a mediadores inflamatorios, leucotrienos B, histamina, IL-4, IL-5, IL-13, eotaxina, RANTES, estrés oxidativo, etc. están involucrados principalmente en la aparición del asma, mientras que TNF-alfa, IL-8, GRO-alfa, etc. están involucrados principalmente en la aparición de la EPOC; (c) en lo que respecta al síndrome inflamatorio, el asma muestra un síndrome inflamatorio diferente por la actuación sobre el tracto pulmonar general a una edad temprana, como el AHR (hiper-receptividad de las vías respiratorias), el desprendimiento epitelial, la fibrosis, la relación no parenquimatosa, la secreción de mocos, la obstrucción relativamente reversible de las vías respiratorias, tos, estornudos, disnea, etc. de la EPOC, que se produce cuando actúa sobre vías respiratorias periféricas en adultos y muestra diversos fenómenos como la metaplasia epitelial, destrucción parenquimatosa, obstrucción de las vías respiratorias relativamente irreversible, bronquitis crónica, enfisema, etc. (Barnes PJ (2000b) Mechanisms in COPD: differences from asthma. Chest 117 (supl.): 10S-14S.; Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE y Fabbri LM (2001) Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 163:1304-1309).

Los estudios histopatológicos sobre la EPOC muestran una afectación predominante de las vías respiratorias

periféricas (bronquiolos) y del parénquima pulmonar, mientras que el asma implica la inflamación en todas las vías respiratorias, pero sin afectar al parénquima pulmonar. Hay obstrucción de los bronquiolos, con fibrosis e infiltración con macrófagos y linfocitos T. Hay destrucción del parénquima pulmonar, así como un mayor número de macrófagos y linfocitos T CD8 (citotóxicos) (Saetta M, di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, MAPP CE, Maestrelli P, Ciaccia A, y Fabbri LM (1998) CD8T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157:822-826,). Las biopsias bronquiales muestran cambios similares con una infiltración de macrófagos y células CD8 y un mayor número de neutrófilos en pacientes con EPOC severa (Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, y Saetta M (1998) Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 158:1277-1285).

Al contrario que en el asma, los eosinófilos no son prominentes, excepto durante las exacerbaciones o cuando los pacientes tienen asma concomitante (Fabbri L, Beghe B, Caramori G, Papi A, y Saetta M (1998) Similarities and discrepancies between exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 53:803-808; Fabbri LM, Romagnoli M, Corbetta L, Casoni G, Busljetic K, Turato G, Ligabue G, Ciaccia A, Saetta M, y Papi A (2003) Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 167:418-424).

En consecuencia, el enfoque terapéutico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es diferente al del asma; sin embargo, los tratamientos actuales se centran en el tratamiento, no específico, de ambas enfermedades. Por lo tanto, no ha habido terapias antiinflamatorias específicamente aprobadas para la EPOC, estando las terapias antiinflamatorias disponibles originalmente desarrolladas solo para el asma. Los desafíos que enfrenta la investigación en la EPOC son múltiples; los mecanismos subyacentes a la patología compleja y heterogénea de esta enfermedad requieren de un desciframiento; debe confirmarse el papel de la inflamación en la progresión de la enfermedad. (Hele DJ, Belvisi MG, 2003. Novel therapies for the treatment of inflammatory airway disease, Expert. Opin. Invest. Drug, 12:5-18; J Craig Fox y Mary F Fitzgerald; The role of animal models in the pharmacological evaluation of emerging anti-inflammatory agents for the treatment of COPD, Current Opinion in Pharmacology, 2009, 9:231-242).

Se encuentran en elaboración mejoras en las terapias actuales disponibles para tratar el asma en forma de agonistas beta de acción prolongada, esteroides más seguros y terapias combinadas, proporcionando los anti-colinérgicos un cierto alivio sintomático en la EPOC. Se han utilizado esteroides para tratar las exacerbaciones pero, hasta ahora, no se había demostrado que el tratamiento afectara significativamente al descenso progresivo de la función pulmonar en la EPOC o el desarrollo del asma.

En consecuencia, ha habido hasta el momento muchos estudios para desarrollar nuevos fármacos con potencial para tratar con éxito y, de forma específica, la EPOC.

Los presentes inventores se han centrado en desarrollar un potente agente de tratamiento, derivado de recursos naturales, como plantas, animales, etc. con la suficiente seguridad y eficacia, que tiene una potente actividad inhibidora en la reproducción de células inflamatorias y, finalmente, han encontrado que el extracto de *Pseudolysimachion longifolium* ha mostrado poseer una potente actividad antiinflamatoria, antialérgica y anti-asmática (patente coreana no. 10-860080) y varios compuestos aislados de los mismos, tales como, verprósido (6-O-3,4-dihidroxibenzoilo Catalpol), picróside II (6-O-4-hidroxi-3-metoxibenzoilo Catalpol), verminoside (6-O-3,4-Dihidroxi cinamoilo Catalpol), 6-O-veratroilo Catalpol (6-O-3,4-dimetoxi benzoilo Catalpol), minecoside (6-O-3-hidroxi-4-metoxicinnamoilo Catalpol), Catalpol, etc., también mostraron una potente actividad antiinflamatoria, antialérgica y anti-asmática (patente coreana Publicación N° 10-2006-125499).

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

Según diversos estudios previos sobre la actividad antiinflamatoria, antialérgica y anti-asmática del extracto de *Pseudolysimachion Longifolium* demostrados en la patente coreana n° 10-860080, los presentes inventores han tratado de desarrollar un método más eficiente para preparar ingredientes más potentes y abundantes que muestren la actividad antiinflamatoria, antialérgica y anti-asmática aislada del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.

Sin embargo, no se ha reportado ni descrito acerca de ningún método eficiente para preparar ingredientes más potentes y abundantes; o que los compuestos aislados del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* muestren algún tipo de actividad anti-EPOC potente y específica, exceptuando la bibliografía citada anteriormente.

En consecuencia, los actuales inventores han encontrado un novedoso método industrializado para preparar un extracto purificado que contiene ingredientes activos más abundantes, como los derivados de catalpol del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*, y sus extractos purificados, o los compuestos aislados a partir de estos, mostraron una potente actividad anti-EPOC no agonista de los receptores beta-2 a través de varias pruebas in vivo utilizando ratones machos BALB/c, por ejemplo, una prueba de la inhibición de la proliferación y actividad del

- reclutamiento inflamatorio de inmunocitos y neutrófilos en pulmón causada por la EPOC; una prueba de la inhibición de la reproducción de las quimioquinas implicadas en la descomposición de pneumocitos, como, por ejemplo, MIP-2/CXCL-2, TNF-alfa, KC/CXCL-1 (quimiocinas Gro-alfa) y CXCL-8, etc.; disminuyendo el efecto reductor en la liberación de la expresión IL-1beta, IL-6, TNF-alfa y MMP-9 la activación de NF-kappaB en pruebas con animales usando ratas Sprague-Dawley SPF (por sus siglas en inglés; es decir, específicas y sin patógenos), así como una prueba in vitro, por ejemplo, una prueba de la inhibición en la expresión de MUC5AC (musca oligomérica/formador de gel), induciendo un efecto sobre la expresión de IL-4 en las células Th2 en la prueba del perfil de expresión molecular, etc.
- El documento WO 2006/129964 a1 se refiere a una composición farmacéutica que comprende un extracto de *Pseudolysimachion Longifolium* y los derivados de catapol aislados a partir de estos, teniendo actividad antiinflamatoria, antialérgica y anti-asmática.
- Oh S-R et al. (International Immunopharmacology, 6 (2006), 978-986) describe un efecto supresor del verprósido aislado de *Pseudolysimachion Longifolium* en la inflamación de las vías respiratorias en un modelo de ratón con asma alérgica.
- Song H-H et al. (6º Festival de pósteres KRIBB, 13 de diciembre de 2012, págs. 28-28) describe un aislamiento preparativo de un nuevo compuesto iridoide de *Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum* mediante cromatografía contracorriente a alta velocidad.
- Park EJ et al. (Arch Pharm Res Vol 32, no. 4, 559-564, 2009) describen la farmacocinética de verprósido después de su administración intravenosa y oral en ratas.
- Descripción de la invención**
- El problema que subyace a la presente invención se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas; las realizaciones preferidas pueden llevarse a cabo a partir de las reivindicaciones dependientes adjuntas.
- Más concretamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve en un primer aspecto con una composición farmacéutica que su usa en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), caracterizado porque la composición comprende un extracto purificado que contiene 30-60% (p/p) 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 isovaniloil catalpol y 2-20% (p/p) de 6-O-veratroil catalpol según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.
- En una realización del primer aspecto, dicho extracto purificado se caracteriza por ser preparado mediante un procedimiento de adición de al menos un disolvente de extracción seleccionado entre agua, metanol, etanol, butanol o sus mezclas para obtener *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* seco en el 1er. paso; sometiénolo, al menos, a un método de extracción seleccionado entre extracción por reflujo con agua caliente, extracción con agua fría, ultra-sonicación o extracción convencional repetidamente, para proporcionar el 1er extracto en el 2º paso; suspendiendo el 1er extracto en 0,5-10 veces el volumen (v/v) de agua para proporcionar un extracto suspendido en el 3er paso; añadiendo 0,5-20 veces el volumen (v/v) de butanol, separándolo en una capa de agua y una capa de butanol y recogiendo la capa de butanol para proporcionar el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) en el 3er paso; y sometiendo el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) a, al menos, un procedimiento de purificación seleccionado del grupo consistente en cromatografía de partición de fase inversa, cromatografía de partición en fase normal, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaños o una combinación de estos para proporcionar el extracto purificado que contiene 30-60% (p/p) verprósido, 0,5-10% (p/p) de ácido verátrico, 2-20% (p/p) catalpósido, 1-10% (p/p) de picrósido II, 1-10% (p/p) de isovaniloil catalpol y 2-20% (p/p) de 6-O-veratroil catalpol, según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.
- En una realización adicional del primer aspecto, la composición comprende vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- Más concretamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve en un segundo aspecto por un alimento funcional para la salud para su uso en el alivio de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), caracterizado porque la composición comprende un extracto purificado que contiene 30-60% (p/p) 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 isovaniloil catalpol y 2-20% (p/p) de 6-O-veratroil catalpol, según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.
- En una realización del segundo aspecto, dicho alimento funcional para la salud está en forma de un polvo, gránulo, tableta, cápsula, píldora, suspensión, emulsión, jarabe, bolsa de té, infusión blanqueante o bebida para la salud.
- Será reconocido por cualquier experto en la técnica que los términos "verprósido" y "verprósido" se utilizan indistintamente en el presente documento.

La presente descripción también proporciona un método para tratar o prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad efectiva del nuevo extracto purificado que contiene ingredientes activos como derivados de catalpol de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* o, al menos, uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en ácido verátrico, verprósido, catalpósido, picrósido II, isovaniloil catalpol y 6-O-veratroil catapol, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable del mismo.

La expresión "derivados de catalpol" descrita en este documento comprende verprósido, catalpósido, picrósido II, isovaniloil catalpol y 6-O-veratroil catalpol, etc.

La expresión "*Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*" que se describe en este documento comprende la planta cultivada o naturalmente cultivada y la planta comercialmente disponible, pero no se pretende limitarla en este documento.

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

Específicamente, la expresión "el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1)" se caracteriza por contener un 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 isovaniloil catalpol y 0,3-10% (p/p) de 6-O-veratroil catapol basado en el peso del extracto total (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 isovaniloil catalpol y 1-5% (p/p) de 6-O-veratroil catapol según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*; y/o caracterizado por contener 12,3-47% (p/p) de derivados de catalpósido en extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* y tener la relación mixta relativa (p/p) entre el peso de cada derivado de catalpósido, de 15,0-18,0 partes (p/p) de verprósido, 2,10-2,60 partes (p/p) de catalpósido, 1 parte (p/p) de picrósido II, 1,00-1,30 partes (p/p) de isovaniloil catalpol y 2,00-2,30 partes (p/p) de 6-O-veratroil catapol; preferiblemente, 16,0-17,0 partes (p/p) de verprósido, 2,20-2,50 partes (p/p) de catalpósido, 1 parte (p/p) de picrósido II, 1,10-1,20 partes (p/p) de isovaniloil catalpol y 2,10-2,20 partes (p/p) de 6-O-veratroil catapol; más preferiblemente, 16,20-16,99 partes (p/p) de verprósido, 2,40-2,45 partes (p/p) de catalpósido, 1 parte (p/p) de picrósido II, 1,10-1,19 partes (p/p) de isovaniloil catalpol y 2,10-2,19 partes (p/p) de 6-O-veratroil catapol.

Más concretamente, la expresión "el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1)" se caracteriza por ser preparado mediante un procedimiento que consiste en añadir al menos un disolvente de extracción seleccionado entre agua, un alcohol inferior C1-C4 como, por ejemplo, metanol, etanol, butanol, etc. o sus mezclas, preferiblemente, mezcla de agua y etanol, más preferiblemente, 30-80% (p/p) de etanol en agua a *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* seco en el 1er paso; sometiéndolo, al menos, a un método de extracción seleccionado entre extracción con reflujo con agua caliente, extracción con agua fría, ultra-sonicación o extracción convencional, preferiblemente extracción con agua fría seguida de extracción con reflujo a una temperatura entre 10 y 100°C, preferiblemente de 20 a 90°C, durante un período en el intervalo desde 30 minutos a 72 horas, preferiblemente, de 6 a 48 horas, más preferiblemente, extracción con agua fría a una temperatura en el intervalo de 10 a 60°C, preferiblemente de 20 a 50°C, durante un período en el intervalo desde 30 minutos hasta 72 horas, preferiblemente de 6 a 48 horas y luego una extracción con reflujo a una temperatura en el intervalo de 40 a 120°C, preferiblemente de 60 a 90°C, durante un período en el intervalo desde 30 minutos hasta 72 horas, preferiblemente de 6 a 48 horas, repetidamente, para proporcionar el 1er extracto en el 2º paso; suspender el 1er extracto en aproximadamente 0,5-10 veces el volumen (v/v), preferiblemente, aproximadamente 1-5 veces el volumen (v/v) de agua para proporcionar el extracto suspendido en el 3er paso; y añadir aproximadamente 0,5-20 veces el volumen (v/v), preferiblemente, aproximadamente 1-10 veces el volumen (v/v) de butanol, separando entre una capa de agua y una capa de butanol y recogiendo la capa de butanol para permitir 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 isovaniloil catalpol y 0,3-10% (p/p) de 6-O-veratroil catapol, según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* para tratar y prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

En consecuencia, la presente descripción también proporciona un método para preparar el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) aislado de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* que comprende los pasos de: añadir al menos un disolvente de extracción seleccionado entre agua, un alcohol inferior C1-C4, como el metanol, el etanol, el butanol, etc. o sus mezclas, preferiblemente, la mezcla de agua y etanol, más preferiblemente, 30-80% (p/p) de etanol en agua para *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* en el 1er paso; sometiéndolo, al menos, a un método de extracción seleccionado de extracción con reflujo con agua caliente, extracción con agua fría, ultra-sonicación o extracción convencional, preferiblemente extracción con agua fría seguida de extracción con reflujo a una temperatura en el intervalo de 10 y 100°C, preferiblemente de 20 a 90°C, durante un período comprendido entre 30 minutos y 72 horas, preferiblemente, de 6 a 48 horas, más preferiblemente, extracción con agua fría a una temperatura en el intervalo de 10 y 60°C, preferiblemente de 20 a 50°C, durante un período comprendido entre 30 minutos y 72 horas, preferiblemente de 6 a 48 horas y luego la extracción con reflujo a una temperatura en el intervalo de 40 y 120°C, preferiblemente de 60 a 90°C, durante un período en el intervalo desde

30 minutos a 72 horas, preferiblemente de 6 a 48 horas, repetidamente, para proporcionar el 1er extracto en el 2º paso; suspender el 1er extracto en aproximadamente 0,5-10 veces el volumen (v/v), preferiblemente aproximadamente 1-5 veces el volumen (v/v) de agua para proporcionar el extracto suspendido en el 3er paso; y añadir aproximadamente 0,5-20 veces el volumen (v/v), preferiblemente aproximadamente 1-10 veces el volumen (v/v) de butanol, separando entre una capa de agua y una capa de butanol y recogiendo la capa de butanol para proporcionar un 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 picróside II, 0,3-10% (p/p) de isovaniloil catapol y 0,3-10% (p/p) catapol 6-O-veratroil, según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* para tratar y prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Concretamente, la expresión "extracto purificado (ATC2)" se caracteriza por contener 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 isovaniloil catapol y 2-20% (p/p) de 6-O-veratroil catapol, según el peso del extracto total (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 picróside II, 2-8% (p/p) de isovaniloil catapol y 3-8% (p/p) de 6-O-veratroil catapol según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*; y/o caracterizado por contener 36,5-91% (p/p) de derivados de catalpósido en extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* y tener la relación mixta relativa (p/p) entre el peso de cada derivado de catalpósido, de 13,0-16,0 partes (p/p) de verprósido, 2,20-2,50 partes (p/p) de catalpósido, 1 parte (p/p) de picróside II, 1,10-1,40 partes (p/p) de isovaniloil catapol y 2,00-2,20 partes (p/p) de 6-O-veratroil catapol; preferiblemente 14,0-15,0 partes (p/p) de verprósido, 2,30-2,45 partes (p/p) de catalpósido, 1 parte (p/p) de picróside II, 1,20-1,35 partes (p/p) de isovaniloil catapol y 2,00-2,10 partes (p/p) de 6-O-veratroil catapol; más preferiblemente 14,50-14,99 partes (p/p) de verprósido, 2,35-2,43 partes (p/p) de catalpósido, 1 parte (p/p) de picróside II, 1,25-1,34 partes (p/p) de isovaniloil catapol y 2,01-2,09 partes (p/p) de 6-O-veratroil catapol.

Más preferiblemente, la expresión "extracto purificado (ATC2)" se caracteriza por ser preparado por el procedimiento de adición de al menos un disolvente de extracción seleccionado entre agua, metanol, etanol, butanol, etc. o sus mezclas, preferiblemente, mezclas de agua y etanol, más preferiblemente 30-80 (p/p) de etanol en agua a *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* seco en el 1er paso; sometiéndolo a, al menos, un método de extracción seleccionado de extracción con reflujo con agua caliente, extracción con agua fría, ultra-sonicación o extracción convencional, preferiblemente extracción con agua fría seguida de extracción con reflujo a una temperatura en el intervalo de 10 a 100°C, preferiblemente de 20 a 90°C, durante un período en el intervalo desde 30 minutos hasta 72 horas, preferiblemente de 6 a 48 horas, más preferiblemente, extracción con agua fría a una temperatura en el intervalo de 10 y 60°C, preferiblemente de 20 a 50°C durante un período comprendido entre 30 minutos y 72 horas, preferiblemente de 6 a 48 horas y, luego, una extracción con reflujo a la temperatura en el intervalo de 40 a 120°C, preferiblemente de 60 a 90°C durante un período comprendido entre 30 minutos y 72 horas, preferiblemente de 6 a 48 horas, repetidamente, para proporcionar el 1er extracto en el 2º paso; suspendiendo el 1er extracto en aproximadamente 0,5-10 veces el volumen (v/v), preferiblemente aproximadamente 1-5 veces el volumen (v/v) de agua para proporcionar un extracto suspendido en el 3er paso; añadiendo aproximadamente 0,5-20 veces el volumen (v/v), preferiblemente, aproximadamente 1-10 veces el volumen (v/v) de butanol, separando entre una capa de agua y la capa de butanol y recogiendo la capa de butanol para proporcionar un extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) en el 3er paso; y sometiéndolo a, al menos, un procedimiento de purificación seleccionado entre el grupo consistente en cromatografía de partición de fase inversa, cromatografía de partición de fase normal, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaños para proporcionar el extracto purificado (ATC2) que contenía 30-60% (p/p) de verprósido, 0,5-10% (p/p) de ácido verátrico, 2-20% (p/p) catalpósido, 1-10% (p/p) de picróside II, 1-10% (p/p) de isovaniloil catapol y 2-20% (p/p) de 6-O-veratroil catapol según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* para tratar o prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

En consecuencia, la presente descripción también proporciona un método para preparar el extracto purificado con el fraccionamiento secundario (ATC2) aislado de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* que comprende los pasos de: añadir al menos un disolvente de extracción seleccionado entre agua, un alcohol inferior C1-C4, como el metanol, el etanol, el butanol, etc. o sus mezclas, preferiblemente, la mezcla de agua y etanol, más preferiblemente, 30-80% (p/p) de etanol en agua para *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* en el 1er paso; sometiéndolo, al menos, a un método de extracción seleccionado de extracción con reflujo con agua caliente, extracción con agua fría, ultra-sonicación o extracción convencional, preferiblemente extracción con agua fría seguida de extracción con reflujo a una temperatura en el intervalo de 10 y 100°C, preferiblemente de 20 a 90°C, durante un período comprendido entre 30 minutos y 72 horas, preferiblemente, de 6 a 48 horas, más preferiblemente, extracción con agua fría a una temperatura en el intervalo entre 10 y 60°C, preferiblemente de 20 a 50°C, durante un período comprendido entre 30 minutos y 72 horas, preferiblemente de 6 a 48 horas y luego extracción con reflujo a una temperatura en el intervalo de 40 a 120°C, preferiblemente de 60 a 90°C durante un período en el intervalo de 30 minutos a 72 horas, preferiblemente de 6 a 48 horas, repetidamente, para proporcionar el 1er extracto en el 2º paso; suspender el 1er extracto en aproximadamente 0,5-10 veces el volumen (v/v), preferiblemente aproximadamente 1-5 veces el volumen (v/v) de agua para proporcionar un extracto suspendido en el 3er paso; añadiendo aproximadamente 0,5-20 veces el volumen (v/v), preferiblemente, aproximadamente 1-10 veces el volumen (v/v) de butanol, separándolo entre una capa de agua y la capa de butanol y recogiendo la capa de butanol para

proporcionar un extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) en el 3er paso; y sometiendo el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) a, al menos, un procedimiento de purificación adicional seleccionado entre el grupo constituido por la cromatografía de partición en fase inversa de la invención tal como se define en las reivindicaciones, la cromatografía de partición en fase normal, cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de exclusión por tamaños para proporcionar un 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) catalpósido, 1-10% (p/p) de picróside II, 1-10% (p/p) de isovaniloil catapol y 2-20% (p/p) de 6-O-veratroil catapol según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* para tratar o prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Específicamente, la expresión "procedimiento de purificación adicional" se selecciona de (i) cromatografía de partición de fase inversa, (II) cromatografía de partición de fase normal, (III) cromatografía de intercambio iónico o (IV) cromatografía de exclusión por tamaños, preferiblemente, cromatografía de partición de fase inversa o cualquier cromatografía utilizando cualquier resina como fase estacionaria que pueda retener la sustancia no polar mientras se eluye la sustancia polar, por ejemplo, la resina de Sephadex como Sephadex, Sephadex LH20, Sephadex G-25, Sephadex G-10, Sepharose, Superdex, resina de metilacrilato, carboximetilcelulosa, sulfopropil celulosa, carboximetil Sephadex, sulfopropil Sephadex, carboximetil Sepharose, sulfopropil Sepharose y otras; resina de polímero inverso utilizando el co-polímero estileno-divinilbenceno como el polímero X, HP20, polímero PRP-H1, etc., o resina de soporte de metacrilato, etc; gel de sílice normal, como el producto BPC (cromatografía de fase unida), producto de sílice adquirido de YMC Co. Ltd, producto de sílice adquirido de DAISO Co. Ltd, producto de sílice adquirido de ASahi Co. Ltd, producto de sílice adquirido de COSMOSYL Co. Ltd y otros; producto ODS utilizado para el relleno de HPLC, como el producto ODS adquirido de YMC Co. Ltd, producto ODS adquirido de DAISO Co. Ltd, producto ODS adquirido de ASahi Co. Ltd, producto ODS adquirido de CHEMCO Co. Ltd, producto ODS adquirido de Merck Co. Ltd ODS, producto adquirido de COSMOSYL Co. Ltd, producto adquirido de FUJI Co. Ltd, etc.

En una realización preferida, 1) se adopta (i) la cromatografía de partición de fase inversa como un procedimiento de purificación adicional de la presente invención, la "fase estacionaria en la cromatografía de partición de fase inversa descrita anteriormente" puede ser cualesquiera fases estacionarias, como, por ej., la sustancia de fase inversa como una fase estacionaria que puede retener una sustancia no polar mientras eluye la sustancia polar, preferiblemente, la fase estacionaria basada en gel de sílice, la fase estacionaria basada en polímeros como el poliestireno, etc. y otras como, más preferiblemente, derivados de gel de sílice como C2, C4, C6, C8, C10, C12, 14, C16, C18 y otros; o una fase estacionaria basada en polímeros como PS-2, Oasis HLB y otros como, más y más preferiblemente, gel de sílice de fase inversa (C18(IV)-D), producto ODS-A/ODS-AQ de YMC Co. Ltd., producto SP-C-ODS de CHEMCO Co. Ltd., producto SP-ODS-RPS 1): de la invención tal como se define en las reivindicaciones de DAISO Co. Ltd., producto 5C18 de COSMOSYL Co. Ltd., producto Chromatorex de FUJI Co. Ltd., etc.

En una realización preferida, 1) se adopta (i) la cromatografía de partición de fase inversa como un procedimiento de purificación adicional de la presente invención, la "fase móvil en la cromatografía de partición de fase inversa descrita anteriormente (i)" puede ser al menos un disolvente seleccionado entre agua, acetonitrilo, alcohol inferior como el metanol, etanol, butanol, etc, tetrahidrofurano (THF) o una mezcla de estos, preferiblemente, agua, un alcohol inferior como el metanol, etanol, butanol etc, o una mezcla de estos, más preferiblemente, la mezcla disolvente de agua y metanol, más y más preferiblemente, la mezcla de disolvente de agua y metanol con una proporción entre 90:10 (v/v) y 60:40 (v/v) para eluir la sustancia polar.

En una realización preferida, 1) se adopta (ii) la cromatografía de partición de fase normal como un procedimiento de purificación adicional de la presente invención, la "fase estacionaria en la cromatografía de partición de fase normal descrita anteriormente" puede ser cualquier fases estacionaria, como, por ej., una sustancia de fase normal como una fase estacionaria que puede retener la sustancia polar mientras eluye la sustancia no polar, preferiblemente, fase estacionaria basada en gel de sílice, Fluorosyl, o alúmina, CN, diol, o una fase estacionaria basada en un polímero con un resto NH₂, etc., más preferiblemente, una fase estacionaria basada en gel de sílice, Fluorosyl, o alúmina, etc.

En una realización preferida, 1) se adopta (ii) la cromatografía de partición de fase normal como un procedimiento de purificación adicional de la presente invención, la "fase móvil de la cromatografía de partición de fase normal descrita anteriormente (ii)" puede ser, al menos, un disolvente seleccionado entre hexano, heptano, acetato de etilo, etanol, dietil-éter, 2-propanol o sus mezclas, preferiblemente, hexano, heptano, acetato de etilo o sus mezclas, para eluir las sustancias no polares.

En una realización preferida, 1) se adopta (iii) la cromatografía de intercambio iónico como un procedimiento de purificación adicional de la presente invención, la "fase estacionaria en la cromatografía de intercambio iónico arriba descrita (iii)" puede ser cualesquiera fases estacionarias de alto nivel molecular como una fase estacionaria que tiene la fracción de retención cargada, preferiblemente, una resina de intercambio catiónico, resina de intercambio de aniónico, o un adsorbente sintético, etc., más preferiblemente, una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida como AG 50W-x8, Amberlite IR-120, Dowex 60W-x8, SKIB, etc; una resina de intercambio catiónico débilmente ácida como Amberlite IRA-67, Dowex 3-x4A etc; una 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 y HAAS Co. Ltd.), Lewatit VP OC 1800, Lewatit VP OC 1812, Lewatit MDS1368 Na, Lewatit K1221 (Bayer Co. Ltd.), PUROLITE PCR833CA, PUROLITE 1): de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, C145 (Purolite Co. Ltd.), MFG210, MFG 250 (FINEX Co. Ltd.), etc; una resina de intercambio aniónico fuertemente básica como SA11A, SA20A, SA21A etc; o CaptoQ (GE Healthcare Co. Ltd.), o la resina con propiedades similares a la misma 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; un adsorbente como SP207, HP20SS, HP20 etc, más preferiblemente, HP 20.

En una realización preferida, 1) se adopta (iv) la cromatografía de exclusión por tamaños como un procedimiento de purificación adicional de la presente invención, la "fase estacionaria en la cromatografía de exclusión por tamaños arriba descrita (iv)" puede ser cualesquiera fases estacionarias de tipo gel, como un fase estacionaria que puede separarse por el tamaño de la muestra, preferiblemente, con un gel a base de dextrano como Sephadex (por ejemplo, Sephadex G-25), un gel a base de poliacrilamida como Sephacryl (por ejemplo, Sephacryl-S400), un gel a base de agarosa como Superose o Sepharose (por ejemplo, Sepharose CL-4B) o sus combinaciones, tales como la combinación de Superdex 200 con dextrano (por ejemplo, Sephadex™), o el gel de Agarosa reticulante (Superose™) y otros, sin embargo, no se limitarán a este documento. La "fase móvil en la cromatografía de exclusión por tamaños (iv) descrita anteriormente" puede ser una solución tampón seleccionada del grupo consistente en tampón de acetato de sodio, tampón de fosfato sódico, tampón de acetato de amonio, MES [ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico], Bis-Tris [2-bis(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol], ADA [N-(2-acetamido)iminodiacetato], PIPES [ácido piperaxin-N,N'-bis(2-etanosulfónico)], BES [ácido N,N'-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico], MOPS [ácido 3-(N-morfolino)propansulfónico], TES [ácido N-Tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico], HEPES [ácido N-2-hidroxietil-piperazin-N'-2-etanosulfónico], etc.; preferiblemente, un tampón de acetato de sodio, tampón de fosfato sódico o tampón de acetato de amonio.

En una realización preferida 1) de la presente invención, la presente invención también se puede realizar por (v) cromatografía de permeación de gel o cromatografía de filtración de gel además de (i) cromatografía de partición de fase inversa, (ii) cromatografía de partición de fase normal, (iii) cromatografía de intercambio iónico, (iv) cromatografía de exclusión por tamaños o sus combinaciones, como un procedimiento de purificación más descrito en este documento.

La presente descripción también proporciona un nuevo extracto purificado, tal como (a) el extracto purificado fraccionado con butanol (designado como "ATC1" en adelante) o (b) el extracto purificado con el fraccionamiento secundario (designado como "ATC2" en adelante) preparados por los métodos de preparación descritos anteriormente.

La presente descripción también proporciona un nuevo extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) a partir del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*, preparado por los métodos de preparación descritos anteriormente, que contiene 12,3-47% (p/p) de derivados de catalpósido en 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) catalpósido, 0,3-10% (p/p) de picróside II, 0,3-10% (p/p) de isovaniloil catapol y 0,3-10% (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) catalpósido, 0,5-5% (p/p) de picróside II, 0,5-5% (p/p) de isovaniloil catapol y 1-5% (p/p) de 6-O-veratroil catapol según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.

La presente descripción también proporciona un nuevo extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*, preparado por los métodos de preparación descritos anteriormente, que muestra la relación mixta relativa (p/p) entre el peso de cada derivado de catalpósido de 15,0-18,0 partes (p/p) de verprósido, 2,10-2,60 partes (p/p) catalpósido, 1 parte (p/p) de picróside II, 1,00-1,30 partes (p/p) de isovaniloil catapol y 2,00-2,30 partes (p/p) de 6-O-veratroil catapol; preferiblemente, 16,0-17,0 partes (p/p) de verprósido, 2,20-2,50 partes (p/p) catalpósido, 1 parte (p/p) de picróside II, 1,10-1,20 partes (p/p) de isovaniloil catapol y 2,10-2,20 partes (p/p) de 6-O-veratroil catapol; más preferiblemente, 16,20-16,99 partes (p/p) de verprósido, 2,40-2,45 partes (p/p) catalpósido, 1 parte (p/p) de picróside II, 1,10-1,19 partes (p/p) de isovaniloil catapol y 2,10-2,19 partes (p/p) de 6-O-veratroil catapol.

La presente descripción también proporciona un nuevo extracto purificado con el fraccionamiento secundario (ATC2) del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* preparado por los métodos de preparación descritos anteriormente que contiene 36,5-91% (p/p) de derivados de catalpósido en extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*, en el que dichos derivados de catalpósido consisten en 30-60% (p/p) de verprósido, 0,5-10% (p/p) de ácido verátrico, 2-20% (p/p) catalpósido, 1-10% (p/p) de picróside II, 1-10% (p/p) de isovaniloil catapol y 2-20% (p/p) catapol 6-O-veratroil, según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*; preferiblemente, 40-50% (p/p) de verprósido, 1-5% (p/p) de ácido verátrico, 3-10% (p/p) catalpósido, 2-5% (p/p) de picróside II, 2-8% (p/p) de isovaniloil catapol y 3-8% (p/p) de 6-O-veratroil catapol según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.

La presente descripción también proporciona un nuevo extracto purificado con el fraccionamiento secundario (ATC2)

del extracto de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* preparado por los métodos de preparación descritos anteriormente que muestran la relación mixta relativa (p/p) entre el peso de cada derivado de catalpósido, de 13,0-16,0 partes (p/p) de verprósido, 2,20-2,50 partes (p/p) catalpósido, 1 parte (p/p) de picróside II, 1,10-1,40 partes (p/p) de isovaniloil catalpol y 2,00-2,20 partes (p/p) de 6-O-veratroil catapol; preferiblemente, 14,0-15,0 partes (p/p) de verprósido, 2,30-2,45 partes (p/p) catalpósido, 1 parte (p/p) de picróside II, 1,20-1,35 partes (p/p) de isovaniloil catalpol y 2,00-2,10 partes (p/p) de 6-O-veratroil catapol; más preferiblemente, 14,50-14,99 partes (p/p) de verprósido, 2,35-2,43 partes (p/p) catalpósido, 1 parte (p/p) de picróside II, 1,15-1,24 partes (p/p) de isovaniloil catalpol y 2,01-2,09 partes (p/p) de 6-O-veratroil catapol.

La expresión "extracto purificado" descrita en este documento puede ser utilizada como una forma seca preparada por el método de evaporación al vacío, método de liofilización o método de secado en aire caliente, etc.

El término "prevenir" descrito en este documento comprende cualquier acto para inhibir o posponer la aparición de cierta enfermedad o desorden descrito en este documento por medio de la administración de la composición inventiva; y el término "tratar" descrito en este documento comprende cualquier acto para aliviar o cambiar favorablemente el síntoma asociado con cierta enfermedad o trastorno descrito en este documento por medio de la administración de la composición inventiva.

Los presentes inventores han constatado que el nuevo método industrializado para preparar el extracto purificado puede aportar ingredientes activos más abundantes, es decir, del 36,5% al 91,0% (p/p), como los derivados de catalpol del extracto de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* comparando con el extracto crudo preparado por el método convencional descrito en la técnica anterior, en la que el contenido de los derivados de catalpol es sólo el 8,49% (p/p) a través de diversos análisis de HPLC, por ejemplo, el extracto purificado inventivo (ATC1) contiene 17,60% (p/p) de verprósido, 0,72% (p/p) de ácido verátrico, 2,62% (p/p) catalpósido, 1,08% (p/p) de picróside II, 1,26% (p/p) de isovaniloil catalpol y 2,36% (p/p) de 6-O-veratroil catapol (Ver ejemplo 2) y el extracto purificado inventivo (ATC2) contiene 43,83% (p/p) de verprósido, 1,80% (p/p) de ácido verátrico, 7,07% (p/p) catalpósido, 2,93% (p/p) de picróside II, 3,85% (p/p) de isovaniloil catalpol y 6,15% (p/p) de 6-O-veratroil catapol, mientras que el extracto crudo (CX) preparado por el método convencional descrito en la técnica anterior contiene sólo 5,9% (p/p) de verprósido, 0,21% (p/p) de ácido verátrico, 0,82% (p/p) catalpósido, 0,40% (p/p) de picróside II, 0,42% (p/p) de isovaniloil catalpol y 0,74% (p/p) de 6-O-veratroil catapol, según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum*; extracto crudo, así como el extracto purificado o los compuestos aislados de estos, mostraron una potente actividad anti-EPOC sin respuesta agonista de los receptores beta-2 a través de varias pruebas in vivo utilizando ratones machos BALB/c, por ejemplo, una prueba de inhibición en la proliferación y actividad del reclutamiento de inmunocitos inflamatorios y neutrófilos en pulmón causado por la aparición de EPOC; una prueba de inhibición de la reproducción de quimioquinas implicadas en la descomposición de pneumocitos, como MIP-2/CXCL-2, TNF-alfa, KC/CXCL-1 (quimioquinas Gro-alfa) y CXCL-8, etc; disminuyendo el efecto reductor en la liberación de la expresión de IL-1beta, IL-6, TNF-alfa y MMP-9 la activación de NF-kappaB en pruebas con animales usando SPF (agente específico sin patógenos) en ratas Sprague-Dawley, así como una prueba in vitro, por ejemplo, una prueba de inhibición en la expresión de MUC5AC (moco oligomérico/formación de gel), induciendo un efecto sobre la expresión de IL-4 en células Th2 en la prueba del cambio del perfil de expresión molecular, etc.

Los actuales inventores también han encontrado que la relación en peso combinada maximizada entre el ácido verátrico, el verprósido, el catalpósido, el picróside II, el isovaniloil catalpol y el 6-O-veratroil catapol para tratar y prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), es decir, verprósido (ATC1-68,6%; ATC2-66,8%, intervalo de contenido calculado según el peso total de los compuestos: 45-90 p/p%), ácido verátrico (ATC1-2,8%; ATC2-2,7%, intervalo de contenido calculado según el peso total de los compuestos: 1,5-4,0 p/p%), catalpósido (ATC1-10,2%; ATC2-10,8%, intervalo de contenido calculado según el peso total de los compuestos: 7,0-14,0% p/p), picróside II (ATC1-4,2%; ATC2-4,5%, intervalo de contenido calculado según el peso total de los compuestos: 3,0-6,0% p/p), isovaniloil catalpol (ATC1-4,9%; ATC2-5,8%, intervalo de contenido calculado según el peso total de los compuestos: 3,0-8,0% p/p) y 6-O-veratroil catapol (ATC1-9,2%; ATC2-9,4%, intervalo de contenido calculado según el peso total de los compuestos: 6,0-12,0% p/p).

La presente descripción proporciona una composición farmacéutica o un alimento funcional para mejorar la salud que comprende los compuestos combinados con una relación de peso mixto de 40-93% verprósido, 1,0-10% ácido verátrico, 2,0-25% catalpósido, 1,0-15% picróside II, 1,0-15% isovaniloil catalpol y 2,0-25% 6-O-veratroil catapol, preferiblemente, 45-90% verprósido, 1,0-7,0% ácido verátrico, 3,0-15% catalpósido, 2,0-10% picróside II, 2,0-10% isovaniloil catalpol y 2,0-15% 6-O-veratroil catapol para tratar o prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

La presente descripción proporciona una composición farmacéutica o un alimento funcional para mejorar la salud que comprende los compuestos combinados con una relación de peso mixto de 40-93% verprósido, 1,0-10% ácido verátrico, 2,0-25% catalpósido, 1,0-15% picróside II, 1,0-15% isovaniloil catalpol y 2,0-25% 6-O-veratroil catapol, preferiblemente, 45-90% verprósido, 1,0-7,0% ácido verátrico, 3,0-15% catalpósido, 2,0-10% picróside II, 2,0-10% isovaniloil catalpol y 2,0-15% 6-O-veratroil catapol y los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables para el tratamiento o la prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

En consecuencia, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica o un alimento funcional para la salud que comprende al menos un compuesto seleccionado entre el grupo constituido por ácido verátrico, verprósido, catalpósido, picróside II, isovaniloil catapol y 6-O-veratroil catapol para tratar o prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

- 5 La presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto seleccionado entre el grupo constituido por ácido verátrico, verprósido, catalpósido, picróside II, isovaniloil catapol y 6-O-veratroil catapol y los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables para el tratamiento o la prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

- 10 Por último, la presente descripción proporciona el uso de un nuevo extracto purificado preparado por los métodos descritos anteriormente o al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en ácido verátrico, verprósido, catalpósido, picróside II, isovaniloil catapol y 6-O-veratroil catapol para la fabricación de medicamentos empleados para el tratamiento o la prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

- 15 La expresión "vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables" en este documento definidos comprende "aditivos farmacéuticos", ingredientes inactivos utilizados para preparar los medicamentos. Incluyen tintes, aromatizantes, agentes aglutinantes, emolientes, rellenos, 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 esmalte, que son muy conocidos en la técnica (Ver, página de inicio de la Administración de Alimentos y Medicamentos: www.fda.gov o la información sobre medicamentos en línea: www.drugs.com) o bibliografía anterior (por ejemplo, Rowe, Raymond C et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press, 7ª edición, 2012). También se describe

- 20 También se describe un método de tratamiento o prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en mamíferos, en el que el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del nuevo extracto purificado preparado por los métodos descritos anteriormente o, al menos, un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en ácido verátrico, verprósido, catalpósido, picróside II, isovaniloil catapol y 6-O-veratroil catapol en un mamífero que sufre de pulmonar obstructiva crónica enfermedad (EPOC).

La presente descripción también proporciona

- De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, también se proporciona un método para tratar o prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en mamíferos, caracterizado porque el método comprende administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del nuevo extracto purificado preparado por los métodos descritos anteriormente o, al menos, un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido verátrico, verprósido, catalpósido, picróside II, isovaniloil catapol y 6-O-veratroil catapol y los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables en el mamífero que sufre de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

- 35 La presente descripción también proporciona un método para tratar o prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en mamíferos, caracterizado porque el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de los compuestos combinados con una relación en peso mixto de 40-93% verprósido, 1,0-10% ácido verátrico, 2,0-25% catalpósido, 1,0-15% picróside II, 1,0-15% isovaniloil catapol y 2,0-25% 6-O-veratroil catapol, preferiblemente, 45-90% verprósido, 1,0-7,0% ácido verátrico, 3,0-15% catalpósido, 2,0-10% picróside II, 2,0-10% isovaniloil catapol y 2,0-15% 6-O-veratroil catapol, en el mamífero que sufre de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

- 40 La presente descripción proporciona un método para tratar o prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en mamíferos, caracterizado porque el método comprende administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de los compuestos combinados con una relación en peso mixta de 40-93% verprósido, 1,0-10% ácido verátrico, 2,0-25% catalpósido, 1,0-15% picróside II, 1,0-15% isovaniloil catapol y 2,0-25% 6-O-veratroil catapol, preferiblemente, 45-90% verprósido, 1,0-7,0 ácido verátrico, 3,0-15% catalpósido, 2,0-10% picróside II, 2,0-10% isovaniloil catapol y 2,0-15% 6-O-veratroil catapol y los vehículos farmacéuticamente aceptables o excipientes en un mamífero que sufre de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

- 45 La presente descripción proporciona igualmente un uso de una composición que comprende un nuevo extracto purificado preparado por los métodos descritos anteriormente o al menos un compuesto seleccionado entre el grupo constituido por ácido verátrico, verprósido, catalpósido, picróside II, isovaniloil catapol y 6-O-veratroil catapol y los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables para la fabricación de medicamentos empleados para el tratamiento o la prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

- 50 Por último, la presente descripción también proporciona un uso de una composición que comprende los compuestos combinados con una relación en peso mixta de 40-93% verprósido, 1,0-10% ácido verátrico, 2,0-25% catalpósido, 1,0-15% picróside II, 1,0-15% isovaniloil catapol y 2,0-25% 6-O-veratroil catapol, preferiblemente, 45-90% verprósido, 1,0-7,0% ácido verátrico, 3,0-15% catalpósido, 2,0-10% picróside II, 2,0-10% isovaniloil catapol y 2,0-15% 6-O-veratroil catapol y los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables para la fabricación de medicamentos empleados para el tratamiento o la prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica

(EPOC).

La composición para el tratamiento y la prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica como se define en las reivindicaciones (EPOC) puede estar compuesta por extractos o compuestos como 0,1~99%, preferiblemente, 0,1~50% en peso según el peso total de la composición.

5 En una realización de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, la composición farmacéutica contiene vehículos farmacéuticamente aceptables, adyuvantes o diluyentes, p. ej., lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, malitol, almidones, caucho de acacia, alginato, gelatina, fosfato cálcico, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxi benzoato, propilhidroxi benzoato, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Las formulaciones pueden incluir, además, rellenos, agentes anti-aglutinantes, agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes aromatizantes, emulsificantes, conservantes, etc.

10 Las composiciones de la invención pueden formularse con el fin de proporcionar una liberación rápida, sostenida o retrasada del ingrediente activo después de su administración a un paciente mediante el empleo de cualesquiera de los procedimientos reconocidos en la técnica.

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

20 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse en cualquier forma, tal como una forma de administración oral (polvo, tableta, cápsula, cápsula blanda, medicina acuosa, jarabe, píldora de elixires, polvos, sobres, gránulos), o preparación tópica (crema, ungüento, loción, gel, bálsamo, parche, pasta, solución de pulverización, aerosol y otros), o una preparación inyectable (solución, suspensión, emulsión).

25 La composición de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones en las formas farmacéuticas de administración, puede ser utilizada en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables y también puede ser utilizada sola o en asociación apropiada, así como en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos.

30 La dosis deseable del extracto inventivo o compuesto varía dependiendo de la condición y el peso del sujeto, la gravedad, la forma del medicamento, la ruta y el período de administración, y estos pueden ser elegidos por los expertos en la técnica. Sin embargo, con el fin de obtener efectos deseables, se recomienda generalmente administrar en una cantidad en el intervalo de 0,0001 a 1000 mg/kg, preferiblemente de 0,001 a 100 mg/kg por peso/día del extracto inventivo de la presente invención. La dosis se puede administrar en una sola vez o dividida en varias veces al día.

35 La composición farmacéutica de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, se puede administrar a un animal sujeto, tal como un mamífero (rata, ratón, animales domésticos o humanos) vía varias rutas. Todos los modos de administración se contemplan; por ejemplo, la administración se puede hacer por vía oral, rectal o por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracutánea, intratecal, epidural o intracerebroventricular.

40 En consecuencia, otro objeto de la presente descripción es proporcionar un alimento funcional para la salud que comprenda una cantidad terapéuticamente efectiva del nuevo extracto purificado que contiene los ingredientes activos preparados por los métodos descritos anteriormente o al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en ácido verátrico, verprósido, catalpósido, picrósido II, isovaniloil catalpol y catapol 6-O-veratroil para la prevención o el alivio de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

45 En consecuencia, otro objeto de la presente descripción es proporcionar un alimento funcional para mejorar la salud que comprende los compuestos combinados con una relación en peso mixta de 40-93% verprósido, 1,0-10% ácido verátrico, 2,0-25% catalpósido, 1,0-15% picrósido II, 1,0-15% isovaniloil catalpol y 2,0-25% 6-O-veratroil catapol, preferiblemente 45-90% verprósido, 1,0-7,0% ácido verátrico, 3,0-15% catalpósido, 2,0-10% picrósido II, 2,0-10% isovaniloil catalpol y 2,0-15% 6-O-veratroil catapol para la prevención o el alivio de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

50 La expresión "un alimento para mejorar la salud funcional" definida en este documento, teniendo el alimento funcional una mejor funcionalidad, como, p. ej. una buena funcionalidad física o funcionalidad fisiológica mediante la adición del extracto de la presente invención a los alimentos convencionales para prevenir o mejorar la enfermedades que se han propuesto en seres humanos o mamíferos.

55 Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un alimento para el cuidado de la salud que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un compuesto seleccionado entre el grupo constituido por ácido verátrico, verprósido, catalpósido, picrósido II, isovaniloil catalpol y 6-O-veratroil catapol, junto con un aditivo sitológicamente aceptable para la prevención o el alivio de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

La expresión "un alimento para el cuidado de la salud" definido en el presente documento, no mostrando el alimento

que contiene el extracto o el compuesto o los compuestos de la presente invención un efecto previsto específico, sino un efecto previsto general en pequeñas cantidades, como en los aditivos, o en cantidades totales como en forma de polvos, gránulos, cápsulas, píldoras, tabletas, etc.

La expresión "aditivo sitológicamente aceptable", definida en el presente documento, comprende "cualquier sustancia cuyo uso previsto resulte o se pueda esperar razonablemente que resulte -directa o indirectamente- en su realización como un componente o que afecte de otro modo a las características de cualquier alimento", y se puede clasificar en tres grupos según su origen, es decir, (1) aditivo químicamente sintético como cetonas, glicicina, citrato de potasio, ácido nicotínico, etc; (2) aditivo natural como tinte de caqui, extracto de regaliz, celulosa cristalina, goma guar, etc; (3) el aditivo mixto con tal como L-glutamato de sodio, conservantes, tinte de alquitrán, etc, o varias categorías de acuerdo a su función en el alimento, por ejemplo, un agente espesante, agente de maduración, agente blanqueador, secuestrante, humectante, antiaglomerante, agentes aclaradores, agente de curado, emulsionante, estabilizador, espesante, bases y ácidos, agentes espumantes, nutrientes, agente colorante, agente aromatizante, edulcorante, agente conservante, antioxidante, etc., que son muy conocidos en la técnica o en la bibliografía anterior (Véase, " Codex General Standard for Food Additives " (GSFA, Codex Stan 192-1995) en la página de inicio de GSFA online: www.codexalimentarius.net/gsfaonline/index.html).

Si una sustancia se añade a un alimento para un fin específico en ese alimento, se denomina aditivo directo y los aditivos alimentarios indirectos son aquellos que se convierten en parte del alimento en cantidades traza debido a su envasado, almacenamiento u otro tipo de manipulación.

La expresión "alimentos para el cuidado de la salud o alimentos funcionales", descritos en este documento, puede referirse a alimentos, bebidas saludables, suplementos dietéticos, etc, y estos pueden ser formulados en una forma de dosificación farmacéutica como un polvo, gránulo, tableta, suspensión, emulsión, jarabe, chicle, cápsula, bebida, etc; o como un alimento, por ejemplo, un pan, una torta de arroz, frutos secos, caramelos, chocolates, goma de mascar, helados, leches como la leche desnatada, leche hidrolizada con lactosa, leche de cabra, leche procesada, productos lácteos como la leche fermentada, mantequilla, leche concentrada, nata, mantequilla, queso natural, queso procesado, leche en polvo, suero de leche, etc., productos cárnicos procesados como hamburguesas, jamón, salchichas, tocino, etc., productos con huevo procesados, productos de carne de pescado, como tortas de pescado, etc., productos de pasta como los fideos instantáneos, fideos secos, fideos mojados, fideos fritos, fideos no fritos, fideos secos gelatinizados, fideos cocinados, fideos congelados, pasta, etc., productos de té como las bolsitas de té, el té lixiviado, etc., bebidas saludables como batidos de frutas, batidos vegetales, refrescos carbonatados, bebidas de leche de soja, bebidas lácticas, bebidas mixtas, etc, alimentos para condimentar como la salsa de soja, pasta de soja, pasta de pimiento rojo, chunjang (una especie de producto de soja fermentado de color caramelo), el cheonggukjang (soja fermentada natural por *B. subtilis*), pasta mixta, vinagre, cremas, ketchup, curry, aderezos, etc., margarina, manteca, pizza, etc., pero no se pretende limitarlos a estos, para prevenir o mejorar la enfermedad referida.

También, el extracto descrito anteriormente se puede agregar a los alimentos o bebidas para la prevención y la mejora del trastorno objeto. La cantidad del extracto descrito anteriormente o un compuesto o compuestos en alimentos o bebidas como alimento para la mejora de la salud funcional o alimentos para el cuidado de la salud generalmente puede oscilar entre 0,01 y 100% p/p del peso total de los alimentos para la composición de alimentos beneficiosos para la salud. En particular, aunque la cantidad preferible del extracto en los alimentos beneficiosos para la salud, los alimentos para mejorar la salud o los alimentos de nutrientes especiales puede variar de acuerdo con la finalidad prevista de cada alimento, se utiliza preferentemente en general para su uso como aditivo en una cantidad del extracto o compuesto o compuestos en el intervalo de 0,01 a 5% en alimentos como fideos y otros, de 40 a 100% en alimentos para el cuidado de la salud en la proporción del 100% de la composición de los alimentos.

Siempre que la composición de bebidas beneficiosas para la salud de la presente invención, tal como se definen en las reivindicaciones, contenga el extracto descrito anteriormente o un compuesto o varios compuestos como componentes esenciales en la proporción indicada, no habrá ninguna limitación particular en el otro componente líquido, en donde el otro componente puede estar constituido por varios edulcorantes o carbohidratos naturales, etc., como en las bebidas convencionales. Ejemplos de los carbohidratos naturales antes mencionados son los monosacáridos, tales como la glucosa, fructosa, etc; disacáridos, tales como la maltosa, sacarosa, etc.; azúcares convencionales como la dextrina, ciclodextrina; y alcoholes de azúcar como el xilitol, y el eritritol, etc. Como otros edulcorantes ya mencionados, pueden ser favorablemente útiles edulcorantes naturales como la taumatina, el extracto de estevia como la levauudiosidea, la glicirricina, etc., y edulcorantes sintéticos como la sacarina, el aspartamo etc. La cantidad de carbohidratos naturales descritos anteriormente está generalmente entre aproximadamente 1 y 20 g, preferiblemente entre 5 y 12 g en la proporción de 100 ml de la composición de la bebida presente.

Los otros componentes de la composición mencionada anteriormente son diversos nutrientes, una vitamina, un mineral o un electrolito, un agente aromatizante sintético, un agente colorante y un agente mejorante en el caso del queso, el chocolate et al., el ácido péctico y sus sales, el ácido alginico y sus sales, ácidos orgánicos, adhesivos coloidales protectores, agentes del control del pH, estabilizadores, conservantes, glicerina, alcohol, agentes carbonizantes utilizados en las bebidas carbonatadas, etc. Otro componente diferente a los mencionados anteriormente puede ser un zumo de fruta para la preparación de zumos de fruta naturales, bebidas con zumos de

fruta y bebidas vegetales, caracterizado porque el componente se puede utilizar de forma independiente o en combinación. La relación de los componentes no es tan importante, pero generalmente se encuentra en el intervalo de 0 y 20% p/p por 100% p/p de la presente composición. Ejemplos de alimentos comestibles que comprenden el extracto o compuesto mencionado anteriormente son varios alimentos, bebidas, chicles, complejos vitamínicos, alimentos para la mejora de la salud y otros.

El extracto, o el compuesto o los compuestos de éste, no poseen toxicidad ni efectos adversos, por lo tanto, se pueden utilizar con seguridad.

Efectos ventajosos de la invención

Como se ha descrito, el extracto purificado que contiene abundantes ingredientes activos, tales como los derivados de catalpol del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*, o al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo constituido por ácido verátrico, verprósido, catalpósido, picrósido II, isovaniloil catalpol y 6-O-veratroil catapol demostró una potente actividad anti-EPOC no agonista de los receptores beta-2 a través de varias pruebas in vivo utilizando ratones machos BALB/c, por ejemplo, una prueba de inhibición de la proliferación y la actividad de los inmunocitos inflamatorios y neutrófilos que se reclutan de los pulmones, causados por la EPOC; una prueba de la inhibición de la reproducción de quimioquinas implicadas en la destrucción de pneumocitos, tales como MIP-2/CXCL-2, TNF-alfa, KC/CXCL-1 (quimioquinas Gro-alfa) y CXCL-8 etc; el efecto reductor en la liberación de la expresión de IL-1beta, IL-6, TNF-alfa y MMP-9 disminuyendo la activación de NF-kappaB en pruebas con animales y usando ratas Sprague-Dawley SPF (específicas sin patógenos), así como una prueba in vitro, por ejemplo, una prueba de inhibición en la expresión de MUC5AC (moco oligomérico/formador de gel), induciendo un efecto sobre la expresión de IL-4 en células Th2 en la prueba del perfil de expresión molecular, etc. Por lo tanto, puede ser utilizado como agente terapéutico o alimento beneficioso para la salud en el tratamiento y la prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra un análisis HPLC del extracto crudo de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* preparado en el ejemplo comparativo 1;

La Fig. 2 muestra un análisis HPLC del extracto purificado inventivo (ATC1) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* preparado en el ejemplo 1;

La Fig. 3 muestra un análisis HPLC del extracto purificado inventivo (ATC2) de *Pseudolysimachion rotundum* var *Subintegrum* preparado en el ejemplo 2;

La Fig. 4 muestra un procedimiento esquemático para establecer modelo de línea celular que expresa GPCR de ADRB2;

La Fig. 5 muestra la formación de manchas en células tratadas con U2OS con los agonistas ADRB ya conocidos;

La Fig. 6 muestra la formación de manchas en células tratadas con U2OS con el extracto y los compuestos purificados inventivos;

La Fig. 7 muestra el resultado digitalizado de la expresión de MUC5AC utilizando HSC;

La Fig. 8 representa el cambio de expresión de MUC5AC en células A549 tratadas con TGFb1;

La Fig. 9 representa el cambio de expresión de MUC5AC en células A549 que fueron tratadas previamente con el extracto purificado inventivo o los compuestos y luego tratadas con TNF- α ;

La Fig. 10 representa el cambio de la expresión de MUC5AC en células A549 tratadas con acroleína, el extracto purificado inventivo o los compuestos;

La Fig. 11 presenta el efecto del extracto purificado inventivo o los compuestos en la inducción de la diferenciación de Th2 de las células T CD4+ naive (CD4+CD62L+);

La Fig. 12 presenta el efecto del extracto purificado inventivo o los compuestos en la diferenciación de Th2 de ratón;

La Fig. 13 presenta el efecto del extracto purificado inventivo o los compuestos en la expresión de IL-4, un marcador de diferenciación de las células Th2 en ratón;

La Fig. 14 presenta el efecto del extracto purificado de la invención o los compuestos respecto al número de inmunocitos totales, neutrófilos y el nivel de linfocitos T después de la inhalación de LPS (i.t) en ratones BALB/c y la exposición al humo de cigarrillos;

La Fig. 15 presenta el efecto del extracto o los compuestos purificados inventivos en el número de células T CD4+ & CD8+ en BALF (A: número total de células ($\times 10^5$)/BALF (ml); B: número de neutrófilos ($\times 10^4$)/BALF (ml); C: número

absoluto de linfocitos T CD4⁺ & CD8⁺ ($\times 10^4$)/BALF (ml), los datos se expresaron como número de células medias \pm SEM ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $P < 0,001$ frente a LPS + CS; $n = 10$);

La Fig. 16 presenta el efecto del extracto o los compuestos purificados inventivos en el nivel de CXCL-1, TNF- α y MIP-2 después de la inhalación de LPS (i.t.) en ratones BALB/c y la exposición al humo de cigarrillos;

5 La Fig. 17 presenta el efecto del extracto purificado de la invención o los compuestos en el número de células inflamatorias;

La Fig. 18 presenta el efecto del extracto purificado de la invención o los compuestos en el número total de células en BALF;

10 La Fig. 19 presenta el efecto del extracto purificado inventivo o los compuestos en la actividad MMP-9 en el tejido pulmonar;

La Fig. 20 presenta el efecto del extracto purificado de la invención o los compuestos en la expresión de proteínas proinflamatorias en el tejido pulmonar;

La Fig. 21 representa el efecto inhibitorio del extracto inventivo purificado en la respuesta inflamatoria en células del tejido pulmonar mediante un examen histológico del lavado broncoalveolar;

15 Ejemplos

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

1-1. Preparación del extracto crudo (ATE)

20 1 kg de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* secado (cultivado en 244, Soimyeon Eumseong-Gun Chungcheongbuk-do en Corea según GAP) se cortó en trozos pequeños 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 con reflujo a 78°C durante 12 horas para recoger el filtrado, tres veces. El extracto se filtró con papel de filtro para eliminar los desechos. El filtrado recogido se concentró en un evaporador rotatorio (EYELA, N-2100, Japón) a 55~65°C bajo presión reducida y se secó con un liofilizador para obtener 202 g de un extracto crudo seco (designado como "ACE" en adelante) para su uso como ejemplo comparativo.

25 1-2. Análisis de componentes

El análisis de los componentes se realizó mediante HPLC (Agilent 1260 Model, EE.UU.) según las condiciones de la Tabla 1 y el resultado se mostró en la Fig. 1.

30 Como puede observarse en la Fig. 1, se ha confirmado que cada ingrediente se detectó a 9,548 minutos (Verprósido), 10,817 minutos (Ácido verátrico), 16,728 minutos (Catalpósido), 20,346 min (Picrósido II), 21,853 min (Isovaniloil catalpol) y 30,462 min (6-O-veratrolil catalpol), respectivamente.

[Fórmula matemática 1]

contenido de cada ingrediente = concentración del patrón (mg/ml)/concentración de la muestra de prueba (mg/ml) \times At/As \times pureza del patrón (%)

35 en la que "At" representa el área de ingrediente en la muestra de prueba y "As" representa la del patrón, siempre que el volumen muestreado de la muestra de la prueba y el patrón sean idénticos entre sí.

Tabla 1

Condición de HPLC			
Condición de HPLC			
Bomba	Bomba Agilent 1260 series, 1260 Quart		
Detector	Agilent serie 1260, 1260 DAD		
Columna	Agilent Eclipse XOB C18, 4,6 x 50CM, 5 μ m		
Caudal	1,5 ml/min		
Absorbancia UV	266nm		
Fase móvil	Fase móvil A: tampón fosfato (pH = 3,5) *Fase móvil B: metanol		
	Hora	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		

En el resultado, se ha confirmado que el extracto crudo de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* contenía sólo un 8,49% (p/p) de derivados de catalpósido, es decir, un 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 isovanilil catalpol, y 0,74% (p/p) de 6-O-veratroil catalpol, respectivamente, como puede observarse en la Tabla 2.

Tabla 2

Resultado de HPLC (extracto crudo: ACE)		
Ingrediente activo	Ejemplo comparativo 1	
	Tiempo de retención (minutos)	Contenido (p/p%)
Verprósido	9,548	5,90
Ácido verátrico	10,817	0,21
Catalpósido	16,728	0,82
Picrósido II	20,346	0,40
Isovaniloil 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*

El extracto crudo (ACE) de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* preparado por el método convencional de acuerdo con el ejemplo comparativo 1 fue suspendido en 2 L de agua destilada y la suspensión se añadió con 2 L de butanol para separarse en una fracción soluble en butanol y otra fracción soluble en agua. La fracción soluble en butanol fue recogida, concentrada bajo presión reducida y secada para proporcionar 82 g del extracto purificado inventivo fraccionado con butanol (ATC1) utilizado como ejemplo de prueba.

El análisis de componentes se realizó mediante HPLC (Agilent 1260 Model, EE.UU.) según la condición de la Tabla 1 y el resultado se mostró en la Fig. 2.

Como puede parecer en la Fig. 2, se ha confirmado que cada ingrediente se detectó a 9,545 minutos (Verprósido), 10,821 minutos (ácido Verátrico), 16,727 minutos (catalpósido), 20,345 min (picrósido II), 21,853 min (Isovaniloil catalpol), y 30,462 minutos (6-O-veratroil catalpol), respectivamente.

El contenido de cada ingrediente (%) en la muestra se calculó con referencia al patrón de HPLC (tiempo de retención) según la fórmula matemática 1.

En el resultado, se ha confirmado que el extracto purificado inventivo fraccionado con butanol (ATC1) de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* contenía un 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 isovanilil catalpol, y 2,36% (p/p) de 6-O-veratroil catalpol, respectivamente, como puede observarse en la Tabla 3.

Tabla 3

Resultado de HPLC (extracto crudo: ATC1)		
Ingrediente activo	Ejemplo 1	
	Tiempo de retención (minutos)	Contenido (p/p%)
Verprósido	9,545	17,60

Ácido verátrico	10,821	0,72
Catalpósido	16,727	2,62
Picrósido II	20,345	1,08
Isovaniloil 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 inventivo fraccionado con butanol (ATC1) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* según el ejemplo 1 se disolvió en 75 ml de disolvente mixto (agua destilada: metanol = 1:0,003) y 75 g de la solución se cargaron en una columna cromatográfica de fase inversa (C18 (IV)-D-75-120nm, AGC Si-Tech Co. Ltd., Japón, 450 g) con elución de la suspensión mediante la elución del disolvente (agua destilada:metanol = 90:10 → 60:40). 8,4 L de la solución eluida que se pasaron en el sistema disolvente de elución inicial (agua destilada:metanol = 90:10) fueron recogidos y concentrados bajo presión reducida. 5,6 L de la solución eluida que se pasaron en el sistema disolvente de elución tardía (agua destilada:metanol = 60:40) fueron recogidos y concentrados bajo presión reducida y secados para proporcionar 33 g del extracto purificado inventivo con el fraccionamiento secundario (ATC2) utilizado como ejemplo de prueba.

El análisis de los componentes se realizó mediante HPLC (Agilent 1260 Model, EE.UU.) según las condiciones de la Tabla 1 y el resultado se mostró en la Fig. 3.

Como puede parecer en la Fig. 3, se ha confirmado que cada ingrediente se detectó a 9,525 minutos (Verprósido), 10,818 minutos (Ácido verátrico), 16,721 minutos (Catalpósido), 20,346 min (Picrósido II), 21,857 min (Isovaniloil catalpol), y 30,462 min (6-O-veratroil catalpol), respectivamente.

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

En consecuencia, se ha confirmado que el extracto purificado inventivo con el fraccionamiento secundario (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 isovanilil catalpol, y 6,15% (p/p) de 6-O-veratroil catalpol, respectivamente, como puede observarse en la Tabla 4.

Tabla 4

Resultado de HPLC (extracto purificado: ATC2)		
Ingrediente activo	Ejemplo 2	
	Tiempo de retención (minutos)	Contenido (p/p%)
Verprósido	9,524	43,83
Ácido verátrico	10,818	1,80
Catalpósido	16,721	7,07
Picrósido II	20,346	2,93
Isovaniloil catalpol	21,857	3,85
6-O-veratroil catalpol	30,462	6,15
Total		65,63

Ejemplo 3. Preparación de compuestos inventivos de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*

Los compuestos inventivos, es decir, verprósido, ácido verátrico, catalpósido, picrósido II, isovaniloil catalpol, y 6-O-veratroil catalpol, que poseen las siguientes propiedades fisicoquímicas, fueron purificados a partir del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* según el método de aislamiento descrito en la publicación de patente coreana n° 10-2006-125499, y las propiedades fisicoquímicas de cada compuesto se compararon con las de las bibliografías ya publicadas para la identificación de cada estructura química.

1. verprósido (= 6-O-(3,4-dihidroxibenzoil)catalpol)

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 2,47 (1H, dd, J= 8,0, 9,2 Hz, H-9), 2,59 (1H, dddd, J= 1,6, 4,0, 8,0, 8,0, H-5), 3,00

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

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

2. picróside II (= 6-O-(4-hidroxi-3-metoxibenzoil)catapol)

- 10 ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2,47 (1H, *dd*, *J* = 8,0, 9,6 Hz, H-9), 2,58 (1H, *dddd*, *J* = 1,2, 6,0, 8,0, 8,4 Hz, H-5), 3,00 (1H, *m*, H-G4), 3,05 (1H, *m*, H-G2), 3,14 (1H, *m*, H-G5), 3,18 (1H, *m*, H-G3), 3,42, 3,71 (2H, *m*, H-G6), 3,67 (1H, *s ancho*, H-7), 3,72, 3,92 (2H, *d*, *J* = 13,2, cada uno, H-10), 4,62 (1H, *d*, *J* = 7,6 Hz, H-G1), 4,99 (1H, *dd*, *J* = 4,4, 6,0 Hz, H-4), 5,06 (1H, *d*, *J* = 8,4 Hz, H-6), 5,11 (1H, *d*, *J* = 9,6 Hz, H-1), 6,42 (1H, *dd*, *J* = 1,2, 6,0 Hz, H-3), 6,89 (1H, *d*, *J* = 8,4 Hz, H-5'), 7,46 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-2'), 7,52 (1H, *dd*, *J* = 2,0, 8,4 Hz, H-6'), 3,83 (3H, *s*, 3'-O-CH₃).

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

3. catalpósido (=6-O-(4-hidroxibenzoil)catapol)

- 20 ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2,47 (1H, *dd*, *J* = 8,0, 9,6 Hz, H-9), 2,56 (1H, *dddd*, *J* = 1,2, 4,0, 8,0, 8,0 Hz, H-5), 3,00 (1H, *m*, H-G4), 3,05 (1H, *m*, H-G2), 3,14 (1H, *m*, H-G5), 3,18 (1H, *m*, H-G3), 3,43, 3,72 (2H, *m*, H-G6), 3,69 (1H, *s ancho*, H-7), 3,72, 3,92 (2H, *d*, *J* = 13,2 Hz, cada uno, H-10), 4,62 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-G1), 4,96 (1H, *dd*, *J* = 4,0, 6,0 Hz, H-4), 5,05 (1H, *dd*, *J* = 1,2, 8,0 Hz, H-6), 5,11 (1H, *d*, *J* = 9,6 Hz, H-1), 6,42 (1H, *dd*, *J* = 1,2, 6,0 Hz, H-3), 6,86 (2H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-3', -5'), 7,85 (2H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-2', -6').

- 25 ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 92,9 (C-1), 141,1 (C-3), 101,8 (C-4), 35,1 (C-5), 79,6 (C-6), 58,2 (C-7), 65,8 (C-8), 41,8 (C-9), 119,6 (C-1'), 131,7 (C-2', 6'), 115,5 (C-3', 5'), 162,6 (C-4'), 165,5 (C-7'), 97,8 (C-G1), 73,4 (C-G2), 76,4 (C-G3), 70,3 (C-G4), 77,5 (C-G5), 61,4 (C-G6).

4. isovaniloil catalpol (= 6-O-(3-hidroxi-4-metoxibenzoil)catapol)

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

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

- 35 5. 6-O-veratroil catalpol (= 6-O-(3,4-dimetoxibenzoil)catapol)

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

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

Ejemplo experimental 1. Desarrollo del sistema de ensayo basado en células ADBR2 GPCR

- 45 Con el fin de desarrollar el sistema de ensayo basado en células ADBR2 GPCR, se realizó la prueba siguiente.

1-1. Desarrollo de la línea celular que expresa ADBR2 GPCR

- 50 Fue clonado ADBR2 (receptor adrenérgico beta-2) GPCR (receptor acoplado a proteínas G, Sinco Biological Inc., HF10378-M) en el vector pIRESpuo (Clontech, Mountain View, CA), transformado en U2OS (ATCC, HTB-96, línea celular de osteosarcoma humana) y tratado con medio de crecimiento complementado con DEME (HyClone), 10% de FBS (HyClone, SH 30071,03) y 1% de antibióticos (GIBCO, 15140) para seleccionar una sola colonia.

Las colonias estables seleccionadas fueron inoculadas en placas de 96 pocillos y en muestras de ensayo, es decir,

Indacaterol (control positivo, Zhiyu biotechnology, China) y 24 horas después de la inoculación, éstas fueron tratadas con el extracto ATC2 preparado en el ejemplo. Las células fueron fijadas con solución de formalina durante 5 minutos, lavadas con agua esterilizada y se confirmó la formación de manchas usando el software del detector de manchas (ThermoFisher, EE.UU.) como se muestra en la Fig. 4.

5 1-2. Evaluación de la eficacia del control positivo

Fueron tratados 10 micromoles de agonistas de ADBR2 anteriormente conocidos, es decir, isopreterenol, salmeterol, formoterol, salbutamol e indacaterol (Zhiyu Biotechnology, China) con las células U2OS seleccionadas que expresaban de forma estable ADBR2 GPCR y la formación de manchas por el tratamiento se determinó mediante el uso de un software del detector de manchas en el aparato Cellomics (ThermoFisher, EE.UU.).

- 10 Como puede observarse en la Fig. 5, se ha confirmado que todos los grupos tratados con agonistas ADBR2 ya conocidos (isopreterenol, salmeterol, formoterol, salbutamol e indacaterol), especialmente, indacaterol, mostraron una formación de manchas aparente y los agonistas beta 2, tales como el indacaterol, forman manchas aparentes actuando como un agonista ADRB2 (beta 2-receptor), mientras que el ATC2 a 40 mg/ml no formó manchas.

1-3. Evaluación de la eficacia de las muestras de ensayo

- 15 Fueron tratados 40 µg/ml de ATC2, así como los compuestos inventivos, es decir, 20 micromoles de verprósido, ácido verátrico, catalpósido, picrósido II, isovaniloil catalpol, y 6-O-veratroil catalpol, respectivamente, a las células U2OS seleccionadas de manera estable que expresaban ADBR2 GPCR y la formación de manchas por el tratamiento se determinó mediante el uso del software del detector de manchas en el aparato Cellomics (ThermoFisher, Estados Unidos).

- 20 Como se puede ver en la Fig. 6, se ha confirmado que todos los grupos tratados con ATC2, así como los compuestos inventivos, es decir, 20 micromoles de verprósido, ácido verátrico, catalpósido, picrósido II, isovaniloil catalpol, y 6-O-veratroil catalpol, no muestran la formación de manchas, lo que significa la presencia de ADRB2-GFP en el receptor. Según estos resultados, se ha conformado que el extracto de ATC y los compuestos inventivos no actuaron como un agonista de ADBR2,

- 25 En consecuencia, también se ha confirmado que el extracto inventivo y los compuestos inventivos dirigidos directamente a MUC5AC, un objetivo terapéutico principal, y la prevención de la expresión MUC5AC, podrían resolver los problemas existentes del tratamiento convencional, como el tratamiento por agonistas beta 2, por ejemplo, reacción adrenérgica frente al receptor beta 2 como hipopotasemia, calambres, ansiedad, taquicardias, latidos ventriculares prematuros, etc. y respuestas adversas en caso de administración oral como las arritmias, epilepsias, etc. causadas por los cambios irregulares en la concentración de medicamentos sanguíneos.

Ejemplo experimental 2. Desarrollo del sistema de ensayo basado en células que reconocen 5AC de mucina

- 35 Se ha demostrado que 5A/C de mucina es una diana importante para desarrollar agentes que tratan la EPOC (Busse PJ, Zhang TF, Srivastava K, Schofield B, Li XM. 2007, Effect of ageing on pulmonary inflammation, airway hyperresponsiveness and T and B cell responses in antigen-sensitized and -challenged mice. *Clinical & Experimental Allergy*. 37 (9): 1392403, Smirnova MG, Birchall JP, Pearson JP. 2000, TNF-alpha in the regulation of MUC5AC secretion: some aspects of cytokine-induced mucin hypersecretion on the in vitro model. *Cytokine*, 12:17326).

- 40 En consecuencia, los presentes inventores desarrollaron una nueva prueba de detección de alto rendimiento introduciendo un sistema de cribado de alto rendimiento que podía determinar cuantitativamente la expresión de la proteína diana en el nivel de las células animales y, con el fin de detectar el agente de inhibición de la expresión de 5AC de mucina, a continuación se realizó la prueba modificando el método activador de la diana publicado en Cellomics BioApplication.

2-1. Digitalización de la expresión de 5A/C de mucina mediante HSC

- 45 Fue sembrada la línea celular A549 (ATCC, CCL-185), una línea celular epitelial aislada del tejido del cáncer de pulmón humano en 96 placas de pocillos (5.000 células/pocillo) y 24 hrs después de la siembra, fueron añadidos 20 ng/ml de bFGF, 100ng/ml de EGF, 20 micromoles de IGF, 5 ng/ml de TGF-beta1, 30 nanomoles de acroleína, 5 nanomoles de PMA, 1 microgramo/ml, LPS y 20 ng/ml de IL-lbeta. La expresión de 5A/C de mucina fue digitalizada por el programa activador de la diana en el aparato de Cellomics.

Como se puede ver en la Fig. 7, se ha confirmado que todas las sustancias probadas, excepto TGF-betal, aumentaron la expresión de MUC5A/C.

- 50 2-2. Digitalización del efecto inhibitor del TGF-betal sobre la expresión de 5A/C de mucina

Fueron tratadas varias concentraciones de TGF-beta 1 (PeproTech, N°. 100-21), es decir, 1, 5 y 10 ng/ml de TGF-beta 1 con la línea celular A549 (ATCC, CCL-185), y la expresión de 5A/C de mucina fue digitalizada por el programa activador de la diana en el aparato de Cellomics.

Como puede observarse en la Fig. 8, se ha confirmado que el TGF-beta1 inhibió más la expresión de MUC5A/C que el medio de control (GM, DMEM, 10% de FBS, 1% de antibióticos).

2-3. Digitalización del efecto inhibitor del TNF-alfa en la expresión de 5A/C de mucina

5 Fueron tratadas varias concentraciones de extracto de ATC2 con la línea celular A549 durante 2 horas y luego se añadieron 20 g/ml de TNF-alfa (Sigma, H8916) durante 24 horas. La expresión de 5A/C de mucina fue digitalizada por el programa activador de la diana en el aparato de Celloomics.

Como se puede ver en la Fig. 9, se ha confirmado que la expresión de MUC5A/C era inhibida eficazmente con el tratamiento del TNF-alfa, lo que aumentaba la expresión de MUC5A/C de una manera dependiente de la dosis en el caso de que ATC2 se trataba con anterioridad.

10 2-4. Efecto inhibitor de las muestras de prueba inventivas en la expresión de 5A/C de mucina

La línea celular A549 diluida (ATCC, CCL-185) con medio DMEM complementado con 5% de fenol rojo y FBS (suero bovino fetal) fue sembrada en placas de 6 pocillos (4x10⁵ células/pocillo) para adherirse a ésta por una noche, y fueron añadidos 20 y 40 microgramos/ml de extracto de ATC2 con la línea celular A549 durante 1 hora. La acroleína 30 nM fue tratada con esto para inducir la expresión de 5A/C de mucina. El medio fue retirado de las células, lavado con solución de PBS y homogeneizado con Trizol (Invitrogen, CA, EE.UU.) para realizar el aislamiento de los ácidos ribonucleicos de las células durante 5 minutos. Las células fueron recogidas, transferidas a un separador centrífugo, completamente mezcladas con cloroformo durante 15 segundos, se dejaron reposar durante 3 minutos y se centrifugaron durante 15 minutos a una velocidad de 14.000 rpm. El sobrenadante que contenía los ácidos ribonucleicos se transfirió a un nuevo tubo y se mezcló con alcohol isopropílico durante 10 minutos. La solución se centrifugó para descartar el sobrenadante y se añadió un 75% de etanol al precipitado. El precipitado se centrifugó durante 5 minutos a una velocidad de 10.000 rpm y el sobrenadante fue descartado. El ácido ribonucleico precipitado se secó a temperatura ambiente durante 20 minutos. El ácido ribonucleico seco fue suspendido en agua destilada tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato, W2004, www.biosesang.com, Corea). Después de la cuantificación del ácido ribonucleico, el ADN complementario fue sintetizado usando 1 microgramo de ARN y RT-kit (kit Omniscript RT, Qiagen, EE.UU.) y el ADNc sintético fue utilizado como plantilla. El cebador 5A/C de mucina (directo; 5-CGA CAA CTA CTT CTG CGG TGC-3, inverso: 5-GCA CTC ATC CTT CCT GTC GTT-3) fue mezclado con éste, desnaturado durante 5 minutos a 94°C utilizando PCR Mix (DreamTaq™ PCR Master Mix, Fermentas, EE.UU.), hecho reaccionar durante 40 ciclos, es decir, 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 45 segundos a 72°C y sometido a PCR durante 5 minutos a 72°C para la inactivación enzimática. GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, Bioneer Corporation, www.bioneer.co.kr, Corea) fue utilizado como un patrón interno.

Como se puede ver en la Fig. 10, se ha confirmado que la expresión de MUC5A/C se incrementó por el tratamiento con acroleína mientras que era inhibida con el tratamiento del extracto inventivo (ARC2) o con compuestos inventivos tales como verprósido o 6-O-veratroil catalpol en una forma dependiente de la dosis.

Ejemplo experimental 3. Efecto de la inhibición en la diferenciación celular de Th2 de ratón

35 3-1. Desarrollo de la diferenciación celular de Th2 de ratón

Se aislaron células T aCD4⁺ (CD4⁺CD62L⁺) de los ganglios linfáticos y los bazo de ratones C57BL6 que se usaban por MACS (Miltenyi Biotec, n°. pedido 130-090-976) y las células T CD4⁺ recogidas se cultivaron en las placas recubiertas con anti-CD3 (1 µg/ml, BD pharmingen) y anti-CD28 (0,5 µg/ml, BD pharmingen).

40 La diferenciación de las células TH2 fue inducida por el medio RPMI complementado con anti-IFN-gamma y rmIL-4 (Hyclone) y el grado de diferenciación fue determinado por FACS (citometría de flujo, Becton-Dickinson, FACSCalibur).

Como se puede ver en la Fig. 11, se ha confirmado que se utilizó el estado de prueba establecido ya que el grado de diferenciación de esta condición se determinó en un total de 29,6%, de manera similar al de la condición convencionalmente disponible utilizada por el medio comercial para inducir la diferenciación de las células TH2 (38%, Merck Milipore, FCIM025162) y la diferenciación de las células TH2 fue inducida a los 3 días después de la inducción de la diferenciación mediante una nueva confirmación de la inducción de la expresión del marcador a través del experimento RT-PCR (S1000 Thermal Cycler, Bio-Rad) usando marcadores de diferenciación Th2 (IL-4 y GATA3) para determinar la expresión del ARNm.

3-2. Efecto sobre la diferenciación celular de Th2 de ratón

50 Fueron aisladas células T CD4⁺ de ratones atímicos (CD4⁺CD62L⁺Miltenyi Biotec, 130-093-227) de los ganglios linfáticos y los bazo de ratones C57BL6 que utilizaban MACS (Miltenyi Biotec, n°. de pedido 130-090-976) y se añadieron 5, 10, 20 y 40 microgramos/ml de ATC2 a esto cuando la célula se inducía a diferenciarse en células Th2. El grado de diferenciación de Th2 fue determinado por la expresión del agente de diferenciación de IL-4.

Como se puede ver en la Fig. 12, se ha confirmado que el grado de diferenciación Th2 en el grupo de ensayo

tratado con diversas concentraciones de ATC2 se ha reducido de manera dependiente de la dosis, 19,2% en caso de 5 microgramos/ml de ATC2 mientras que en el grupo control fue 29,6%. Sin embargo, se redujo el número total de células del grupo de ensayo tratadas con 20 y 40 microgramos/ml de ATC2 y, por lo tanto, se ha confirmado que menos de 10 microgramos/ml de ATC2 mostraban una concentración inhibitoria efectiva de la diferenciación de Th2 sin afectar al número total de células.

En consecuencia, se ha confirmado que menos de 10 microgramos/ml de ATC2 es la concentración adecuada en la prueba.

3-3. Efecto sobre el cambio espectral en la expresión molecular implicada en la diferenciación de células Th2

Fueron aisladas células T CD4⁺ de ratones atímicos (CD4⁺CD62L⁺Miltenyi Biotec, 130-093-227) de ganglios linfáticos y bazo de ratones C57BL6 que utilizaban MACS (Miltenyi Biotec, nº de pedido. 130-090-976) y se añadieron 2,5, 5 y 10 microgramos/ml de ATC2 a esto cuando la célula era inducida a diferenciarse en células Th2. El grado de diferenciación de Th2 fue determinado por la expresión del agente de diferenciación de IL-4.

Como se puede ver en la Fig. 13, se ha confirmado que la expresión de IL-4 fue inducida sólo en las células Th2 comparando con las células de ratones atímicos y la expresión del agente de diferenciación de IL-4 se redujo bruscamente a aproximadamente 60% en el grupo tratado con 2,5 microgramos/ml de ATC2, aproximadamente el 30% en el grupo tratado con 5 microgramos/ml de ATC2, y aproximadamente el 5% en el grupo tratado con 10 microgramos/ml de ATC2.

El estrés oxidativo causado por el tabaquismo o la polución del aire da lugar a un aumento de la destrucción del mantenimiento alveolar, un aumento de la apoptosis y de la respuesta inflamatoria, la inducción del desequilibrio de proteasa/anti-proteasa, y la intensificación de la inflamación a través del envejecimiento y la respuesta autoinmune, dando como resultado la aparición de la enfermedad EPOC después de un lapso de 30-50 años. La EPOC mostró características particulares, por ejemplo, en la obstrucción del atrapamiento de aire y en enfisemas o la inflamación específica en pulmón, tal como el aumento del nivel de macrófagos, neutrófilos, linfocitos T, células CD 8, quimioquinas, etc.

La presente prueba analizó la concentración efectiva de muestras de prueba (ATC2, Verproside, roflumilast) en ratones inducidos por la EPOC por la instilación intratraqueal (i.t.) de LPS y CS.

Como consecuencia, se ha confirmado que más de 15 mg/kg de ATC2, 15 mg/kg de verprósido y 15 mg/kg de roflumilast mostraron una inhibición similar en el número total de inmunocitos, neutrófilos y linfocitos T, etc. en BALF. Más de 15 mg/kg de ATC2, 15 mg/kg de verprósido y roflumilast, 15 mg/kg de roflumilast, mostraron una inhibición similar en el nivel reproducido de TNF- α , KC/CXCL-1 y MIP-2, un mediador que destruye los alvéolos pulmonares.

A través de estos resultados, se ha confirmado que más de 15 mg/kg de ATC2, 15 mg/kg de verprósido y 15 mg/kg de roflumilast mostraron una potente actividad anti-EPOC a través de la inhibición de la proliferación y activación de neutrófilos reclutados del pulmón causados por la aparición de EPOC.

Ejemplo experimental 4. Prueba en modelos animales (ratones)

Con el fin de determinar el efecto anti-EPOC del extracto inventivo o los compuestos en el número de inmunocitos totales, neutrófilos y linfocitos T, etc. en BALF, y el nivel reproducido de TNF- α , KC/CXCL-1, y MIP-2, a continuación se realizó la prueba mediante el uso de EPOC inducida en ratones.

4-1. Experimentos con animales

Se compraron en Orient Co. (www.orient.co.kr, Seúl, Corea) ratones BALB/c machos sin patógenos específicos (de aproximadamente 18-20 g) con 8 semanas de edad, que se rastrearon serológicamente con rutinas para detectar patógenos respiratorios relevantes, y se criaron permitiendo su acceso libre a alimentación y agua en la sala de cría controlada a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad de $55 \pm 15\%$ en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y aclimatada con el ambiente experimental durante 1 semana.

4-2. Medicamentos y administración

1) Muestra de prueba

Se disolvieron 4 tipos de muestras de prueba, es decir, ATC2 (30 mg/kg), Verproside (30 mg/kg), Indacaterol (30 mg/kg), roflumilast (30 mg/kg) en 0,5% CMC (carboximetilcelulosa sódica) y se utilizaron como muestras de ensayo.

(2) Administración

Se mezclaron 30 mg/kg de cada ATC2, Verproside, Indacaterol y roflumilast con 100 μl de la mezcla LPS + CS {LPS (100 $\mu\text{g/ml}$) + extracto de cigarrillo estándar (fumar cigarrillos (CS), 4 mg/ml) = 1:1} y se administraron oralmente a los ratones, 1 hora antes de la instilación intratraqueal (i.t.).

(3) Preparación del extracto de cigarrillo estándar (fumar cigarrillos; CS)

- material de prueba: se utilizaron 60 piezas de cigarrillo estándar CM7 (Coresta Monitoring Cigarette 7, Heinr Borgwaldt, Alemania) e isopropanol, etanol (Merck, Alemania), n-heptadecano (Sigma-Aldrich, EE.UU.) como materiales de prueba y fueron utilizadas máquinas de fumar automáticas (ISO 3308 producto estandarizado, máquina de fumar automática, modelo no.: RM20, Heinr Borgwaldt) en el experimento.

4-3. Recolección de humo convencional

(1) Recolección de humo convencional

El humo convencional de cigarrillos estándar CM7 (Coresta Monitoring Cigarette 7, Heinr Borgwaldt, Alemania) se recogió de acuerdo con el procedimiento descrito en KS H ISO (Organización Internacional de Normalización) de la norma 3402 (tabaco y productos del tabaco -atmósfera para el acondicionamiento y las pruebas) y la directriz coreana (pauta de determinación para el componente dañino en el supresor del deseo fumador del tipo cigarrillos, octubre, 2012, KFSA) y se realizaba en la sala de fumadores (Temp.: $22 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa: $60 \pm 5\%$).

El cigarrillo fue sometido a combustión según el procedimiento de fumar norma ISO, es decir, con un volumen de humo ($35,0 \pm 0,3$ ml), un intervalo de fumar ($60 \pm 0,5$ s), un tiempo de fumar ($2,00 \pm 0,02$ s) y una longitud de colilla del cigarrillo (papel de fumar + 3 mm, envoltura + 3 mm) mediante una máquina de fumar Automatic (producto estandarizado ISO 3308, máquina de fumar automática, modelo N°.: RM20/CS, Heinr Borgwaldt, Alemania) conforme a la norma ISO3308 (cigarrillo analítico rutinario-máquina de fumar-definición y condiciones estándar) y la TPM (materia particulada total) del cigarrillo fue recogida usando el filtro Cambridge de 92 mm (producto estandarizado ISO3308, RM20, Heinr Borgwaldt, Alemania) conforme a la norma ISO3308 (KS H ISO3308, 2000).

(2) Peso de la materia particulada total (TPM)

El peso del soporte del cigarrillo que contenía el filtro Cambridge combustionado previamente se determinó de acuerdo con la norma ISO4387 y luego el peso del soporte del cigarrillo (RM20/CS, Heinr Borgwaldt, Alemania) que contenía el humo del cigarrillo recogido por el filtro Cambridge (RM20, Heinr Borgwaldt, Alemania) después de la combustión para calcular el contenido del TPM (KS H ISO 4387, 2000; Cigarettes - Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical smoking machine) y la directriz coreana (Determination guideline for the harmful component in Cigarette type smoking desire suppressor, octubre, 2012, KFSA).

Como consecuencia, se confirmó que el contenido de TPM, en el caso de que el cigarrillo estándar se combustione tres veces, era determinado en 16,0621 mg (19 piezas), 15,9135 mg (20 piezas), 15,5380 mg/cig (20 piezas), respectivamente. El número total probado de cigarrillos estándar fue de 59 piezas y el TPM fue de 47,5136 mg.

(3) Extracción del TPM del cigarrillo

El filtro Cambridge que contenía RPM se aisló del soporte de cigarrillos y se vertió en un matraz Erlenmeyer de 100 ml. Se añadieron 50 ml de isopropanol, se mezcló, se dejó solo a temperatura ambiente durante más de 8 horas para extraerlo. Después de la extracción, la solución se filtró, se concentró bajo vacío y se transfirió al vial de centelleo (Wheaton, 03-340-25N, EE.UU.) para concentrarlo en gas nitrógeno.

El contenido del TPM de cigarrillo en el humo convencional se calculó de acuerdo con las fórmulas empíricas siguientes 1.

[Fórmula empírica 1]
<cálculo del contenido de TPM>

$$\text{TPM (mg/cig)} = \frac{W_{FHA} - W_{FHB}}{N}$$

donde TPM indica la materia particulada total;

W_{FHA} indica el peso del soporte del filtro después de fumar;

W_{FHB} indica el peso del soporte del filtro antes de fumar;

N indica el número de cigarrillos fumados (vig.)/Trampa.

4-4. Procedimiento de ensayo

(1) Modelo animal de la EPOC

Fueron anestesiados ratones machos BALB/c de 8 semanas de edad con 7% de hidrato de cloral y se les hizo inhalar a estos ratones (i.t.) 100 µl de la mezcla LPS + CS {LPS (100 µg/ml) + extracto de cigarrillo estándar (humo de cigarrillos (CS), 4 mg/ml) = 1:1} durante tres semanas una vez a la semana para preparar el modelo animal de la EPOC. Brevemente, se les hicieron inhalar a los ratones en ayunas (i.t.) 100 µl de la mezcla de LPS + CS uniformemente por la nariz y la boca. Los grupos probados se dividieron en seis grupos, es decir, (i) grupo normal sin tratamiento (intacto), (ii) grupo de control tratado con la mezcla de LPS + CS (EPOC-control), (iii) grupo de muestras de ensayo tratado con ATC2 (30 mg/kg, p.o.) 1 h antes con tratamiento LPS + CS (EPOC-ATC2), (iv) grupo de muestras de ensayo tratados con Verproside (30 mg/kg, p.o.) 1 h antes del tratamiento con LPS + CS (EPOC-verproside), (v) grupo de muestras de ensayo tratado con indacaterol (30 mg/kg, p.o.) 1 h antes del tratamiento LPS + CS (EPOC-Indacaterol), y (vi) grupo de muestras de ensayo tratados con roflumilast (30 mg/kg, p.o.) 1 h antes del tratamiento con LPS + CS (EPOC-roflumilast). Después del final del experimento, la sangre, el BALF y los neumocitos de cada ratón fueron aislados y recogidos para la prueba.

(2) Aislamiento de PBMC de la sangre y determinación del número de células

Después del final del experimento, fueron recogidos 800~1000 µl de sangre de los ratones a los que se les había inyectado 40 µl de 30 UI de heparina (APU8AF, JW Pharmaceutical, Corea) y luego se anestesiaron con éter etílico según punción cardíaca. Se añadieron 500 µl de sangre recolectada a 9,5 ml de una solución ACK (A1049201, Invitrogen, EE.UU.) y se dejó reposar durante 5 minutos para disolver los eritrocitos. La sangre se centrifugó durante 5 minutos a una velocidad de 1200 rpm para aislar las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) y se tiñeron con 0,04% de azul de tripano (15250061, Invitrogen, EE.UU.) para contar el número total de células/ml.

(3) Aislamiento del BALF (fluido BAL) y determinación del número total de células

Después de la recogida de la sangre, fue inyectado 1 ml de medio sin FBS/DMEM contenido en el inyector a la tráquea de ratones sometidos a autopsias, y los ratones se ataron haciendo circular la sangre tres veces y aislando las células de BALF. La sangre fue aislada, tratada con AK a 37°C durante 5 minutos para disolver los eritrocitos, fue lavado con medio sin FBS/DMEM y teñida con 0,04% de azul de tripano para contar el número total de células.

(4) Aislamiento de la célula pulmonar (pneumocitos) y la determinación del número total de células

Se separaron los pulmones de los ratones de los que BALF no se había aislado y el tejido pulmonar se cortó en rodajas. Las rodajas se añadieron a 3 ml de medio DMEM (LM001-05, Welgene, Corea) sin suero bovino fetal (FBS) y se añadió al medio 1 mg/ml de collagenasa IV (C5138, Sigma-Aldrich, EE.UU.). El medio fue incubado con una incubadora de agitación (KMC480S, VISION SCI, Corea) a 37°C durante 30 minutos y el tejido se digirió más de cuatro veces para aislar los pneumocitos. Los pneumocitos aislados fueron lavados con medio y se dejaron pasar a través del colador celular (352350, FALCON, EE.UU.) para extirpar los tejidos no digeridos que no eran células o impurezas. Las células fueron tratadas con solución ACK a 37°C, durante 5 minutos para disolver los eritrocitos, se lavaron de nuevo con el medio, y se tiñeron con 0,04% de azul tripano (15250061, Invitrogen, EE.UU.) para contar el número total de células.

(5) Análisis de FACS

Se ajustaron las PBMC aisladas, BAL (lavado broncoalveolar) y los pneumocitos a 5×10^5 células y se realizó la tinción por inmunofluorescencia a 4°C. Fueron añadidos a esto PE-anti-CD3e (553064, BD Pharmingen, EE.UU.), FITC-anti-CD8 (553031, BD Pharmingen, EE.UU.), PE-anti-CD4 (553047, BD Pharmingen, EE.UU.), PE-anti-Gr-1 (553128, BD Pharmingen, EE.UU.), y FITC-anti-neutrófilos (ab55453, Abcam, UK) respectivamente, y se dejó reaccionar durante 30 minutos en hielo. Después de la reacción, las células se lavaron con solución salina fisiológica de fosfato tamponada más de tres veces y la frecuencia celular (%) de CD3⁺CD4⁺ & CD3⁺CD8⁺, y Gr-1⁺neutrófilos⁺ fue determinada por el programa Cell Quest (643274, BD Biosciences, EE.UU.) del citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton, Dickinson, EE.UU.) y el número total absoluto en cada tejido se calculó aplicando el total de las células.

(6) Análisis ELISA

El nivel de IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-17, MCP-1 y GRO-α (BioSource, EE.UU.) en BALF aislado de ratones fue determinado por el ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas. Los anticuerpos respectivos contra IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-17, MCP-1 y GRO-α se diluyeron con una solución tampón de recubrimiento (291195, R&D System, EE.UU.), recubierta en un placa de micropocillos y se dejó reposar durante la noche a 4°C. Cada pocillo se lavó tres veces con una solución tampón de lavado y se añadieron a la misma 100 µl de suero diluido 10 veces. La solución se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavó dos veces con solución de tampón de lavado (Tween-20, Sigma-Aldrich, EE.UU.), se añadieron 100 µl de anticuerpo HRP conjugado con avidina (DY998, R&D System, EE.UU.), se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó de nuevo. Fueron añadidos a la misma 100 µl de sustrato TMB (555214, BD, EE.UU.). La solución se dejó reposar durante 30 minutos en la sombra y se añadieron 50 µl de una solución de parada (DY994, R&D System, EE.UU.) para determinar la absorbancia mediante un lector ELISA a 450 nm (340PC384, Molecular Devices, EE.UU.).

(7) Determinación de la expresión génica del ARNm en tejido pulmonar

(7-1) Aislamiento del ARN a partir de tejido pulmonar

Fue retirado y triturado en pedazos tejido pulmonar de ratones que se disolvió añadiendo 500 ml de RNazol[®](CS-105B, Tel-Test, EE.UU.). Se añadieron 50 mL de cloroformo (CHCl₃) a la solución mixta flotante y se mezcló de nuevo durante 15 segundos. La solución se dejó reposar durante 15 minutos en hielo, se centrifugó a 13.000 rpm para recuperar aproximadamente 200 mL del sobrenadante y se añadieron 200 mL de 2-propanol al mismo volumen del sobrenadante. La mezcla se dejó reposar durante 15 minutos en hielo, se centrifugó de nuevo a 13.000 rpm, se lavó con 80% de EtOH, y se secó durante 3 minutos con una bomba de vacío (ULVAC, EE.UU.) para extraer el ARN. El ARN extraído se disolvió en 20 mL de agua destilada tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC, IBS-BW1004, Intrón, Corea), y se inactivó con bloques de calentamiento (2050, Lab-Line, India) a 75°C para utilizar en la síntesis del ADNc de primera hebra.

(7-2) Reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa

La reacción de transcripción inversa fue realizada por el procedimiento siguiente: 2 µg de ARN total preparado en bloque de calentamiento se hicieron reaccionar a 37°C durante 30 minutos añadiendo DNasa I (10 U/ml) 2 U/tubo, se desnaturizó a 75°C durante 10 minutos, se añadieron 2,5 ml de una mezcla de dNTP 10 mM (4026, 4027, 4028, 4029, TaKaRa, Japón), 1 ml de secuencia aleatoria Hex-anucleótidos (25 pmol/ 25 mL (11034731001, Roche, Alemania), 1 mL de inhibidor de la Rnasa (2313A, TaKaRa, Japón, 20 U/mL) como inhibidor de ARN, 1 mL de DTT de 100 mM (P1171, Progmega, EE.UU.), 4,5 mL de tampón 5 × RT (M531A, Promega, EE.UU.) y Tris-HCl 250 mM (pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), se añadió de nuevo 1 ml de M-MLV RT (200 U/ml, M1705, Promega, EE.UU.) y el volumen final de la solución se ajustó a 20 ml añadiendo agua destilada tratada con DEPC (pirocarbonato de dietilo). 20 mL de la mezcla de reacción fueron mezclados a conciencia, centrifugados a 2.000 rpm durante 5 segundos, reaccionados a 37°C durante 60 minutos en bloque de calentamiento para sintetizar el ADNc de primera hebra, se dejó reposar a 95°C durante 5 minutos para inactivar M-MLV RT y el ADNc sintetizado se utilizó en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

(7-3) RT-PCR cuantitativa en tiempo real

El ADNc sintetizado se usó en la PCR cuantitativa a tiempo real (Galli SJ. Alergia, Curr. Biol., 10: R93-95, 2006) utilizando el sistema de PCR a tiempo real 7500 (Applied Biosystems, EE.UU.). CATGTTCCAGTATGACTCCACTCAGC (VIC, producto suministrado con Applied Biosystems Co. Ltd.) fue utilizado como la sonda para TGF-β1, MUC5AC, y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) de ratón, y la mezcla Sper-TaqMan PCR Master (4369016, ABI) se utilizó en el experimento para hacerla reaccionar hasta un grado en el que la concentración final llegó a 200 nM. La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó de la siguiente manera: pre-desnaturalización: a 50°C durante 2 min, a 94°C durante 10 min, y 40 ciclos a 95°C durante 0,15 min, a 60°C durante 1 min. Fue utilizado G3PDH (4351309, ABI, EE.UU.) como estándar interno en un grupo de tratamiento y grupo de control RME y la RQ (cuantitativa relativa) fue calculada de acuerdo con las siguientes fórmulas empíricas 2. (Ver Tabla 5)

[Fórmula empírica 2]

$$\text{Grupo diana: } y^{\text{PCR cuantitativa}} = x(1+e)^n$$

x = cantidad inicial, y = rendimiento, n = número de ciclos, e = eficiencia

Tabla 5

Secuencia de nucleótidos de ratón en tiempo real PCR Oligonucleótido		
	Cebador	Secuencia
TGF-β1	Directo	5' tggagcaacatgtggaactc 3'
	Inverso	5' ctgccgtacaactccagtga 3'
MUC5AC	Directo	5' AGAATATCTTTTCAGGACCCCTGCT 3'
	Inverso	5' ACACCAGTGCTGAGCATACTTTT 3'

(8) Examen histopatológico

Se fijó rápidamente pulmón extraído con una solución de formaldehído al 10% (F0161, SAMCHUN, Corea) y se cortó en rodajas. Las rodajas se lavaron con agua corriente durante 8 horas, se incrustaron con epoxi, se cortaron

en rodajas con microtomo (SM2000R, LEICA, Alemania), se tiñeron con hematoxilina y eosina, y se tiñeron con Masson-tricromo para la tinción de deposición del colágeno. Para observar las células de la copa, las células fueron teñidas con tinción PAS (ácido peryódico-Schiff) para observar con un microscopio óptico de 400x (333246, NIKON, Japón).

5 4-5. Estadística

Todos los resultados obtenidos de varios experimentos se registraron como la media \pm error estándar, y la verificación de significancia fue determinada utilizando la prueba T de Student. Los datos anteriores se analizaron de acuerdo con la prueba ANOVA unidireccional para determinar la varianza estadísticamente significativa entre el grupo respectivo para cada punto final determinado y la significancia estadística entre cada grupo se determinó de acuerdo con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y la prueba de comparación múltiple de Dunnett (IBM SPSS Statistics, versión 19.0, software estadístico, Inc, IBM, EE.UU.). La diferencia entre cada control (EPOC-control) fue obvia y, por lo tanto, no se muestra en las figuras y tablas. Los resultados (presentados como media \pm error estándar de la media) se expresaron como valores P: $< 0,05$ (*), $< 0,01$ (**), o $< 0,001$ (***) como estadísticamente significativos.

15 4-6. Resultado de la prueba

(1) Efecto sobre el número total de inmunocitos, neutrófilos y linfocitos T en BALF

El número de células del total de inmunocitos, el número total de células absolutas de neutrófilos⁺ células Gr-1⁺, y el número total de células absolutas de células T CD4⁺ & CD8⁺ en el grupo de control (EPOC-control) aumentó drásticamente en comparación con las del grupo normal (Grupo Balb/c normal). El número total de inmunocitos en el grupo de ensayo tratado con más de 15 mg/kg de ATC2 (5, 10, 15, 30 mg/kg) se redujo en comparación con el grupo de control y los del grupo de ensayo tratados con verprósido (15 mg/kg) y roflumilast (15 mg/kg) ($p < 0,05$) se redujeron drásticamente en comparación con el grupo de control (Fig. 14). El número total de células absolutas de Neutrófilos⁺ células GR-1⁺ (no. total absoluto) en el grupo de ensayo tratado con más de 15 mg/kg ($p < 0,001$) y 30 mg/kg ($p < 0,001$) de ATC2 (5, 10, 15, 30 mg/kg) se redujo en más del 73,2% y 81,9%, respectivamente, en comparación con el grupo de control y los del grupo de ensayo tratado con verprósido (15 mg/kg) ($p < 0,001$) y roflumilast (15 mg/kg) ($p < 0,001$) se redujo en más de un 93,9% y un 97,5%, respectivamente, en comparación con el grupo de control (Fig. 14). El número total absoluto de células de linfocitos T CD4⁺ (no. total absoluto) del grupo de ensayo tratado con 15 mg/kg ($p < 0,01$) y 30 mg/kg ($p < 0,001$) de ATC2 (5, 10, 15, 30 mg/kg) se redujo en más de un 47,7% y en un 19,7% respectivamente, en comparación con el grupo de control y los del grupo de ensayo tratados con verprósido (15 mg/kg) y roflumilast (15 mg/kg) ($p < 0,001$) se redujo en más de 32,9% y 73,2%, respectivamente, en comparación con el grupo de control (Fig. 14C). El número total de células absolutas de células T CD8⁺ (no. total absoluto) en el grupo de ensayo tratado con ATC2 (5, 10, 15, 30 mg/kg) y verprósido (15 mg/kg) no fue significativamente diferente comparado con el grupo de control, mientras que en el grupo de ensayo tratado con roflumilast (15 mg/kg) ($p < 0,001$) se redujo en más de un 67,2% en comparación con el grupo de control (Fig. 14).

En consecuencia, se ha confirmado que los grupos tratados con más de 15 mg/kg de ATC2 (5, 10, 15, 30 mg/kg), Verproside (15 mg/kg) y roflumilast (15 mg/kg) mostraron un potente efecto inhibitorio sobre la proliferación y la activación de inmunocitos inflamatorios y neutrófilos reclutados en pulmón, dando como resultado una potente actividad anti-EPOC.

(2) Efecto sobre el número de neutrófilos en BALF

El número de neutrófilos teñidos con Diff-Quick en el grupo de control (EPOC-control) obtenidos por Cytospin en ratones BALF se incrementó bruscamente en aproximadamente 184 veces en comparación con el grupo normal (grupo normal de BALB/c) (Fig. 15). Como se puede ver en la Fig. 15, el número de neutrófilos en los grupos tratados con 15 mg/kg ($p < 0,001$) y 30 mg/kg ($p < 0,001$) de ATC2 (5, 10, 15, 30 mg/kg) se redujo en más de 89,1% y 72,4%, respectivamente, en comparación con el grupo de control y los de los grupos tratados con verprósido (15 mg/kg) ($p < 0,001$) y roflumilast (15 mg/kg) ($p < 0,001$) se redujeron en más de un 94,2% y un 99,0%, respectivamente, en comparación con el grupo de control.

Por lo tanto, se ha confirmado que los grupos tratados con más de 15 mg/kg de ATC2 (5, 10, 15, 30 mg/kg), Verproside (15 mg/kg) y roflumilast (15 mg/kg) mostraron un potente efecto inhibitorio en la proliferación de neutrófilos recogidos del pulmón, dando como resultado una potente actividad anti-EPOC.

(3) Efecto sobre la reproducción de CXCL-1, TNF- α y MIP-2 en BALF

Varias quimiocinas MIP-2/CXCL-2, TNF- α y proteasa, etc. liberadas del macrófago inflamatorio en el tejido pulmonar destruyen las capas alveolares, y KC/CXCL-1 (quimiocinas Gro- α) y CXCL-8 estimulan los neutrófilos, liberan proteasas y, por lo tanto, destruyen los alvéolos de nuevo, dando como resultado una EPOC (Blidberg K, Palmberg L, Dahlen B, Lantz AS, Larsson K. 2012. Chemokine release by neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Innate Immun.* 18:503-510).

Como se puede ver en la Fig. 16A, que muestra la reproducción de quimiocinas KC/CXCL-1 (quimiocinas Gro- α) de

BALF en ratones determinado por el método ELISA, la reproducción de quimiocinas KC/CXCL-1 (quimiocinas Gro- α) en el grupo control se ha incrementado bruscamente en aproximadamente 5,9 veces en comparación con el grupo de control (grupo normal BALB/c). La reproducción de quimiocinas KC/CXCL-1 (quimiocinas Gro- α) en los grupos tratados con 15 mg/kg y 30 mg/kg ($p < 0,01$) de ATC2 (5, 10, 15, 30 mg/kg) se redujo en más del 46,8% y 83,9%, respectivamente, en comparación con el grupo de control y los grupos tratados con verprósido (15 mg/kg) ($p < 0,05$) y roflumilast (15 mg/kg) ($p < 0,01$) se redujeron en más del 57,4% y 82,7%, respectivamente, en comparación con el grupo control. Como puede observarse en la Fig. 16B, que muestra la reproducción del TNF- α de BALF en ratones determinada por el método ELISA, la reproducción del TNF- α en el grupo control se ha incrementado bruscamente en aprox. 2,8 veces en comparación con la del grupo control (grupo normal BALB/c). La reproducción de TNF- α en los grupos tratados con 15 mg/kg ($p < 0,05$) y 30 mg/kg ($p < 0,01$) de ATC2 (5, 10, 15, 30 mg/kg) se redujo en más de 45,5% y 63,4%, respectivamente, en comparación con el grupo de control y la del grupo tratado con verprósido (15 mg/kg) ($p < 0,05$) y roflumilast (15 mg/kg) ($p < 0,01$) se redujo en más de un 42,2% y un 65,0%, respectivamente, en comparación con el grupo de control. Como puede observarse en la Fig. 16C, que muestra la reproducción de las quimiocinas MIP-2/CXCL-2 de BALF en ratones determinada por el método ELISA, la reproducción de las quimiocinas MIP-2/CXCL-2 en el grupo control se ha incrementado bruscamente en aprox. 5,2 veces en comparación con el grupo control (grupo BALB/c normal). La reproducción de quimiocinas MIP-2/CXCL-2 en los grupos tratados con 15 mg/kg ($p < 0,05$) y 30 mg/kg ($p < 0,001$) de ATC2 (5, 10, 15, 30 mg/kg) se redujo en más del 48,4% y 86,4%, respectivamente, en comparación con el grupo de control y la del tratamiento con verprósido (15 mg/kg) ($p < 0,01$) y roflumilast (15 mg/kg) ($p < 0,001$) se redujo en más de un 63,0% y un 81,9%, respectivamente, en comparación con el grupo de control.

Por lo tanto, se ha confirmado que los grupos tratados con más de 15 mg/kg de ATC2 (5, 10, 15, 30 mg/kg), Verproside (15 mg/kg) y roflumilast (15 mg/kg) mostraron un potente efecto inhibitorio en la reproducción de quimiocinas MIP-2/CXCL-2, TNF- α , KC/CXCL-1 (quimiocinas Gro- α) y CXCL-8, etc. involucradas en la destrucción de células pulmonares, dando como resultado una potente actividad anti-EPOC.

Ejemplo experimental 5. Prueba del modelo animal (ratas)

Con el fin de determinar el efecto anti-EPOC del extracto inventivo o los compuestos en el número de inmunocitos totales, neutrófilos, etc. en BALF, se calculó el nivel reproducido de citoquinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α , la activación de MMP-9, la expresión de proteínas proinflamatorias tales como MMP-9, NF- κ B, y la respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar, a continuación se realizó la prueba mediante el uso de ratones inducidos por la EPOC.

5-1. Animales de experimentación

Fueron compradas en Orient Co. (www.Orient.co.kr, Seúl, Corea) ratas Sprague-Dawley macho específicas sin patógenos (aproximadamente 180-200 g) de 6 semanas de edad y se seleccionaron rutinaria y serológicamente para detectar los patógenos respiratorios relevantes, y se criaron para permitir una alimentación ad libitum (sin antibióticos, Samyang Oil & Feed Corp., Corea) en una sala de cría controlando la temperatura a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, y la humedad a $55 \pm 15\%$ en un ciclo de luz-oscuridad durante 12 horas y aclimatado con un ambiente experimental durante 1 semana.

5-2. Medicamentos y administración

1) muestra de ensayo

Se disolvieron en PBS 3 tipos de muestras de ensayo, es decir, ATC2 (30 mg/kg), Verproside (30 mg/kg), Daxas (ingrediente principal: roflumilast, 1 mg/kg) y se utilizaron como muestras de prueba.

(2) Administración

Se administraron oralmente ATC2, Verproside, Daxas a los ratones a una dosis de 4 mg/kg, 1 hora antes de la instilación intratraqueal (informática).

5-3. Preparación del modelo en ratas de la EPOC

(1) cigarrillo estándar

Fueron utilizados cigarrillos de referencia 3R4f Kentucky (Universidad de California, EE.UU.) como cigarrillos estándar para la generación del humo de los cigarrillos. El cigarrillo, que contenía 9,4 mg de alquitrán, 11 mg de TPM (materia total de partículas) y 12 mg de monóxido de carbono por pieza, se utilizó después de aclimatarlo a una temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y una humedad de $60 \pm 2\%$, después de desempaquetarlo durante 48 ~ 72hrs.

(2) Procedimiento

La exposición al humo de los cigarrillos se realizó utilizando un generador de humo de cigarrillos (CH Technology Corp. USA). Concretamente, 1 hora después de la administración por vía oral de las muestras de prueba utilizando la unidad de exposición de cabeza/nariz solo (TSE System, Alemania) de acuerdo con el método de nariz solo, el

humo del cigarrillo fue expuesto por inhalación durante 3 días cada hora. Se realizaron 8 ráfagas (volumen 35 mL, duración 2 s, intervalo 1 vez/min) por pieza de cigarrillo estándar en el experimento. Los grupos examinados se dividieron en cinco grupos, es decir, (i) grupo normal sin tratamiento (control normal, NC), (ii) grupo de control expuesto al humo de cigarrillos (EPOC), (iii) grupo de muestras de ensayo tratado con Daxas (1 mg/kg, p.o.) 1 h antes de la exposición al humo del cigarrillo (DA), (iv) grupo de muestras de ensayo tratado con ATC2 (30 mg/kg, p.o.) 1 h antes de la exposición al humo del cigarrillo (YPL) y (v) grupo de muestras de ensayo tratado con verprósido (30 mg/kg, p.o.) 1 h antes de la exposición al humo del cigarrillo (Ver). Después del final del experimento, la sangre, BALF, y los pneumocitos de cada rata fueron aislados y recogidos para analizarlos.

5-4. Aislamiento de BALF y determinación del número de inmunocitos

Después de terminar el experimento, las ratas fueron anestesiadas con Zoletil50 (3VX9, Virbac, Francia, p.o.) y se les sacó sangre de las venas caudales. Con el fin de aislar el BALF del pulmón, el bronquio del pulmón derecho fue ligado con sutura y luego se realizó a una traqueotomía. Se puso un IV-uso de catéter (16 GA, 3S-CATH, Dukwoo, Corea) en los bronquios, y ambos los bronquios y el catéter (16 GA, 3S-CATH, Dukwoo, Corea) fueron fijados con sutura. El inyector, que contenía 5 mL de DPBS (solución salina de fosfato tamponada de Dubecco, 14190-250, Invitrogen, EE. UU.) se conectó a éste y el DPBS se vio obligado a circular tres veces para aislar a BALF. El pulmón derecho ligado con sutura fue aislado, fijado con una solución de formalina neutra al 10%, y el tejido pulmonar restante se reservó en el refrigerador a -70°C. El BALF aislado se centrifugó durante 15 minutos a 1500 rpm para preparar un peletes de células y el sobrenadante se reservó en el refrigerador a -70°C para su uso posterior en el análisis de citoquinas. El pelete de células fue suspendido en DPBS y las células se adhirieron a un vidrio de portaobjetos usando la centrifuga de Cytospin (CS03270047, Hanil, Corea). Se realizó una tinción de Diff-Quik (ZS1003, Sysmex, Japón) y las células fueron observadas por microscopía óptica (DM1000, Leica, German) para contar el número de inmunocitos en cada muestra de prueba.

5-5. Análisis de citoquinas en BALF

El nivel de IL-1 β , IL-6 y TNF- α (sistema de R&D, EE.UU.) en BALF aislado de rata fue determinado por el ensayo enzimático inmunoabsorbente (ELISA). El análisis de cada citoquina se realizó de acuerdo con el manual del fabricante, y la absorbancia fue determinada a 450 nm por el lector de ELISA (340PC384, Molecular Devices, EE.UU.).

5-6. La determinación de la expresión de los inmunocitos

(1) Zimografía de gelatina

El tejido pulmonar de rata fue homogeneizado con tampón de lisis tisular (C3228, Sigma-Aldrich, EE.UU.) tratado con un inhibidor de la proteasa (11836153001, Roche, Alemania) y el tejido pulmonar homogeneizado se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos para aislar el sobrenadante. El reactivo de ensayo proteico (500-0006, Bio-Rad, EE.UU.) se utilizó para la cuantificación. Para determinar la actividad de MMP-9, se utilizó el gel de electroforesis dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) que contenía 1% de gelatina (G9382, Sigma-Aldrich, EE.UU.) en el experimento. La proteína se sometió a electroforesis con una dosis de 60 μ g/carril. El gel del zimograma se lavó con 2,5% de Triton X-100 (0694, Amresco, EE.UU.), y se hizo reaccionar durante 16 h a 37°C usando el tampón de desarrollo (1M Tris-HCl, pH 7,5 con CaCl₂, T1503, Sigma-Aldrich, EE.UU.). Después de terminar la reacción, el gel del zimograma fue teñido con azul de Coomassie (0472, Amresco, EE.UU.) y se lavó con un tampón de destañido {500 mL de metanol (M1447, Samchun, Corea) + 1400mL de D. W + 160 mL de ácido acético (9151, J. T. Baker)}. La densidad de la banda MMP-9 fue determinada utilizando un Chemi-doc (170-8070, Bio-Rad, EE.UU.) para determinar la actividad del MMP-9.

(2) Transferencia Western

La proteína obtenida a partir de la homogeneización se sometió a electroforesis a una dosis de 30 μ g/carril y se transfirió utilizando una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (IPVH00010, Millipore, EE.UU.). La membrana (IPVH00010, Millipore, EE.UU.) se bloqueó con un 5% de leche desnatada y luego se hizo reaccionar con anticuerpos anti-MMP-9 (ab38898, Abcam, UK), anti-p65 (SC-372, Santa Cruz, EE.UU.) y anti-p-p65 (sc-33039, Santa Cruz, EE.UU.). Después de terminar la reacción, la membrana se lavó con TBST (solución salina tamponada de Tris que contenía Tween-20 al 0,05%, HT2008, Biosesang, Corea) y se hizo reaccionar con el anticuerpo secundario adecuado (sc-358914, Santa Cruz, EE.UU.) a temperatura ambiente durante 1 hora. La membrana fue lavada de nuevo con TBST y la banda fue confirmada mediante el uso de un kit de quimioluminiscencia (34095, Thermo, EE.UU.).

5-7. Examen histopatológico

El pulmón retirado se fijó rápidamente con una solución de formaldehído al 10% (F0161, SAMCHUN, Corea) y se cortó en rodajas. Las rodajas se lavaron con agua corriente durante 8 horas, se incrustan con epoxi, se cortaron en rodajas con microtomo (CUT4050, MicroTec, Alemania) y se tiñeron con hematoxilina (MHS-16, Sigma-Aldrich, EE.UU.) & eosina (HT110-1-32, Sigma-Aldrich, EE.UU.). Para observar el cambio histopatológico en el tejido pulmonar, las células fueron observadas por microscopio óptico 400x (DM1000, Leica, Alemania).

5-8. Estadísticas

Todos los resultados obtenidos de los diversos experimentos se determinaron mediante una prueba ANOVA unidireccional y la significancia estadística entre el grupo respectivo se verificó de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de Dunnett para obtener un resultado de comparación post hoc.

5 5-9. Resultado de la prueba

(1) Efecto en el número total de inmunocitos en BALF

El aumento característico del nivel de neutrófilos se observó en el grupo inducido por la EPOC. El grupo de control del fármaco tratado con Daxas mostró un menor nivel de neutrófilos, sin embargo, no fue notable en comparación con el grupo inducido por la EPOC. Mientras tanto, los grupos tratados con ATC2 y verprósido mostraron un nivel notablemente menor de neutrófilos e inmunocitos totales en comparación con el grupo inducido por la EPOC (Fig. 17A). Estas reducciones se observaron en la relación entre el nivel de neutrófilos y los inmunocitos totales. El grupo de control positivo tratado con Daxas mostró una proporción similar del número de neutrófilos con la de los inmunocitos en caso de contar 300 inmunocitos al grupo inducido por la EPOC, mientras que los grupos tratados con ATC2 및 Verproside mostraron una proporción notablemente reducida del número de neutrófilos (Fig. 17B).

(2) Efecto sobre la liberación de citoquinas en BALF

En el grupo inducido por la EPOC, el nivel de IL-1 β , IL-6 y TNF- α aumentó bruscamente en BALF. El grupo de control de fármacos tratado con Daxas no mostró una reducción significativa en el nivel de citoquinas en comparación con el grupo inducido por la EPOC. Mientras tanto, los grupos tratados con ATC2 y verprósido mostraron un nivel significativamente menor de citoquinas en comparación con el grupo inducido por la EPOC, cuyo nivel se redujo drásticamente en comparación con el grupo de control de fármacos tratado con Daxas (Fig. 18).

(3) Efecto sobre la actividad de MMP-9 en el tejido pulmonar

En el grupo inducido por la EPOC, la actividad de MMP-9, un importante mediador implicado en la inflamación y la degradación de la matriz extracelular, fue notablemente aumentada. Mientras que los grupos tratados con ATC2 y verprósido mostraron una actividad notablemente menor de MMP-9, cuyo nivel fue similar al grupo de control de fármacos tratado con Daxas (Fig. 19).

(4) Efecto sobre la expresión de la proteína proinflamatoria en el tejido pulmonar

En el grupo inducido por la EPOC, la actividad de proteínas proinflamatorias, tales como MMP-9 y NF- κ B, fue notablemente aumentada. Sin embargo, tal aumento de la expresión de las proteínas proinflamatorias en el grupo inducido por la EPOC, fue significativamente menor en los grupos tratados con ATC2 y verprósido, de manera similar al grupo de control de fármacos tratado con Daxas (Fig. 20).

(5) Efecto sobre la inflamación en el tejido pulmonar

En el grupo inducido por la EPOC, se demostró la infiltración de muchas células inflamatorias dentro de los bronquios, el tejido perivascular y el tejido intersticial, etc. Sin embargo, este aumento de la inflamación en el grupo inducido por la EPOC, fue significativamente menor en los grupos tratados con ATC2 y verprósido, así como el grupo de control de fármacos tratado con Daxas. El efecto inhibitorio sobre la inflamación en los grupos tratados con ATC2 y verprósido fue más potente que en el grupo de control de fármacos tratado con Daxas (Fig. 21).

Por lo tanto, se ha confirmado que ATC2 y los compuestos aislados de ésta, verprósido etc, tienen un efecto potente en el tratamiento de la EPOC a través de la inhibición de la liberación de IL-1 β , IL-6, o TNF- α , la activación de NF- κ B, y la expresión de MMP-9, una causa principal de la EPOC. Se ha confirmado que las actividades de tratamiento de los extractos o compuestos inventivos son similares o más potentes que el agente de tratamiento de la EPOC (Daxas) disponible comercialmente.

Ejemplo experimental 6. Prueba de toxicidad aguda de la administración oral en ratas

La prueba de toxicidad aguda se realizó mediante la administración del extracto inventivo y los compuestos a ratas SPF Sprague-Dawley de 6 semanas de edad.

250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg, 5000 mg/kg de extracto inventivo y los compuestos se administraron por vía oral a cada grupo constituido por 2 ratas y los síntomas de las ratas se observaron durante 14 días. Después de administrar el extracto o los compuestos, se observaron todos los cambios clínicos, es decir, la mortalidad, los signos clínicos, los cambios en el peso corporal y se realizó un análisis de sangre como prueba hematológica y una prueba de bioquímica hematológica. Los cambios anormales de órgano abdominal y órgano torácico se observaron después de la autopsia.

No se han producido cambios en la mortalidad, los signos clínicos, los cambios en el peso corporal y los hallazgos

brutos en ningún grupo ni en ninguno de los géneros. Además, se demostró cierta toxicidad en el grupo de ensayo tratado con 5000 mg/kg del extracto inventivo o los compuestos.

En consecuencia, se ha confirmado que el extracto inventivo y los compuestos preparados en la presente invención eran sustancias potentes y seguras que mostraban LD₅₀ (más de 5000 mg/kg) en su administración oral.

5 Modo para la invención

En adelante en este documento se describirán los métodos de formulación y los tipos de excipientes, pero la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, no se limita a estos. Los ejemplos de preparación representativos se describieron de la siguiente manera.

Preparación de la inyección

Extracto de ATC1	100 mg
metabisulfito de sodio	3,0 mg
Metilparabeno	0,8 mg
Propilparabeno	0,1 mg
Agua destilada para inyección	cantidad óptima

10

La preparación de la inyección se preparó disolviendo el componente activo, controlando el pH a aproximadamente 7,5 y luego llenando todos los componentes en una muestra de 2 ml y esterilizando mediante el método de preparación de inyección convencional.

Preparación del polvo

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

15

La preparación del polvo se preparó mezclando los componentes anteriores y llenando el paquete sellado.

Preparación del comprimido

verprósido	200 mg
Almidón de maíz	100 mg
Lactosa	100 mg
Estearato de magnesio	cantidad óptima

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

20 Preparación de la cápsula

ácido verátrico	100 mg
Lactosa	50 mg
Almidón de maíz	50 mg
Talco	2 mg
Estearato de magnesio	cantidad óptima

Se preparó la tableta mezclando los componentes anteriores y llenando la cápsula de gelatina por el método de preparación de gelatina convencional.

Preparación del líquido

catalpósido	100mg
Azúcar	20g
Polisacárido	20g
Aroma de limón	20g

La preparación líquida se preparó disolviendo el componente activo, y luego llenando todos los componentes en 1000 ml de la muestra y esterilizando mediante el método de preparación líquida convencional.

5 Preparación de alimentos saludables

Extracto de ATC2	1000 mg
Mezcla de vitaminas	cantidad óptima
Acetato de vitamina A	70 g
Vitamina E	1,0 mg
Vitamina B ₁	0,13 mg
Vitamina B ₂	0,15 mg
Vitamina B6	0,5 mg
Vitamina B12	0,2 g
Vitamina C	10 mg
Biotina	10 g
Ácido nicotínico amida	1,7 mg
Ácido fólico	50g
Ácido pantoténico cálcico	0,5 mg
Mezcla mineral	cantidad óptima
Sulfato ferroso	1,75 mg
Óxido de zinc	0,82 mg
Carbonato de magnesio	25,3 mg
Fosfato monopotásico	15mg
Fosfato dicálcico	55 mg
Citrato de potasio	90mg
Carbonato de calcio	100mg
Cloruro de magnesio	24,8 mg

La mezcla de vitaminas y minerales mencionada anteriormente puede variar de muchas maneras. Estas variaciones no deben considerarse como una desviación del espíritu y del alcance de la presente invención.

Preparación de bebidas saludables

6-O-veratroil catalpol	1000 mg
Ácido cítrico	1000 mg
Oligosacárido	100 g
Concentración de albaricoque	2 g
Taurina	1 g
Agua destilada	900 ml

La preparación de bebidas saludables se realizó disolviendo el componente activo, mezclando, agitando a 85°C durante 1 hora, filtrando y luego rellenando todos los componentes en muestras de 1000 ml y esterilizando mediante el método de preparación de bebidas beneficiosas para la salud convencionales.

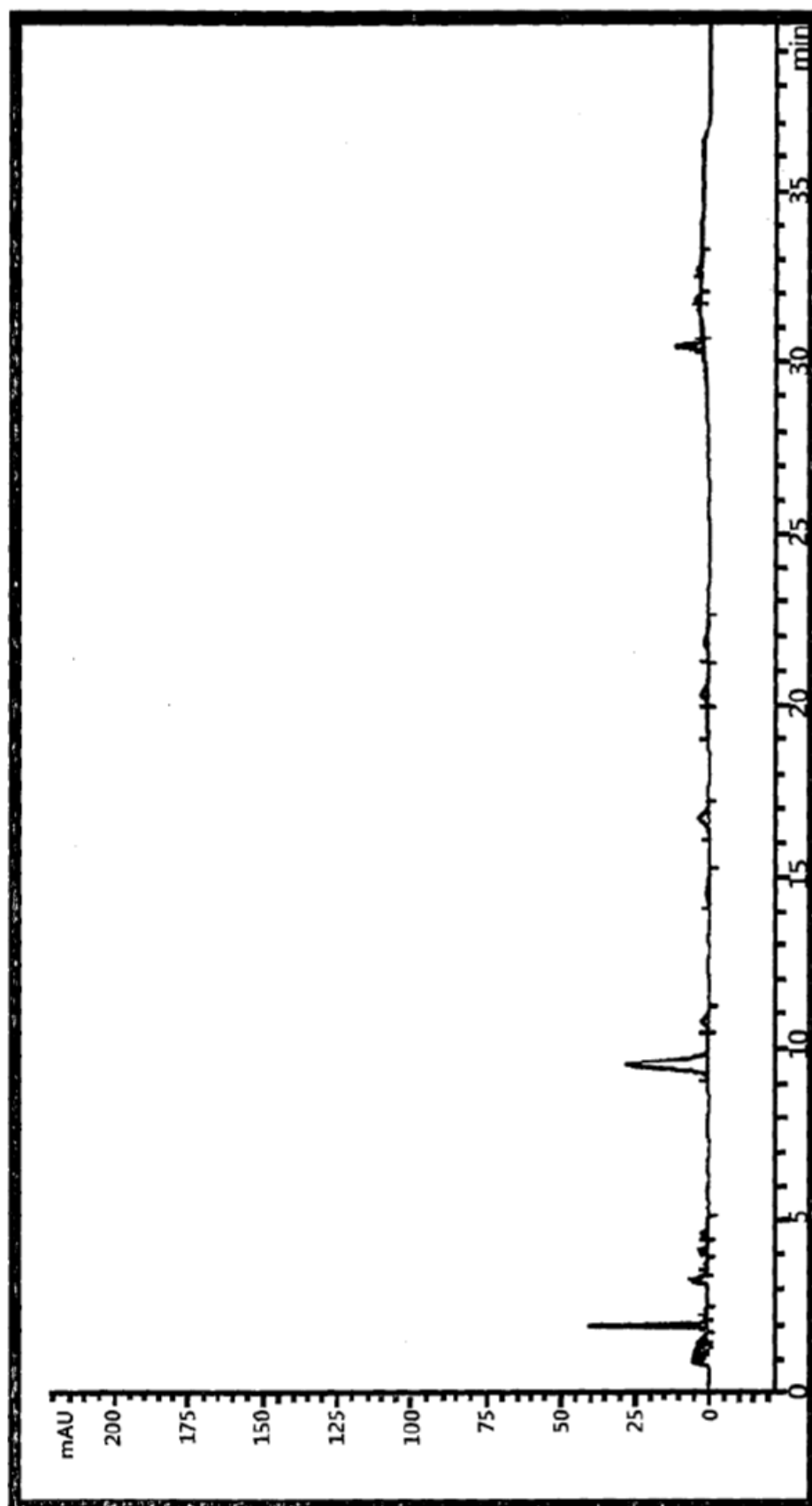
Aplicabilidad industrial

5 Como se describió anteriormente, el extracto purificado que contenía abundantes ingredientes activos, tales como los derivados de catalpol del extracto de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* o, al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo constituido por ácido verátrico, verprósido, catalpósido, picrósido II, isovanilloil
10 catalpol y 6-O-veratroil catapol demostró una potente actividad anti-EPOC sin respuesta agonista de los receptores beta-2 a través de varias pruebas in vivo que utilizaban ratones machos BALB/c, por ejemplo, una prueba de inhibición de la proliferación y la actividad de los inmunocitos inflamatorios y neutrófilos reclutados de pulmones afectados por EPOC; una prueba de la inhibición de la reproducción de quimioquinas implicadas en la destrucción de pneumocitos, tales como MIP-2/CXCL-2, TNF-alfa, KC/CXCL-1 (quimiocinas Gro-alfa) y CXCL-8, etc.; el efecto
15 reductor en la liberación de la expresión de IL-1beta, IL-6, TNF-alfa y MMP-9 disminuyendo la activación de NF-kappaB en pruebas animales usando ratas Sprague-Dawley SPF (específicas sin patógenos), así como una prueba in vitro, por ejemplo, una prueba de inhibición en la expresión de MUC5AC (moco oligomérico/formador de gel), que induce un efecto sobre la expresión de IL-4 de las células Th2 en la prueba del perfil de la expresión molecular, etc. Por lo tanto, puede ser utilizado como agente terapéutico o alimento que beneficie la salud para el tratamiento y la prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

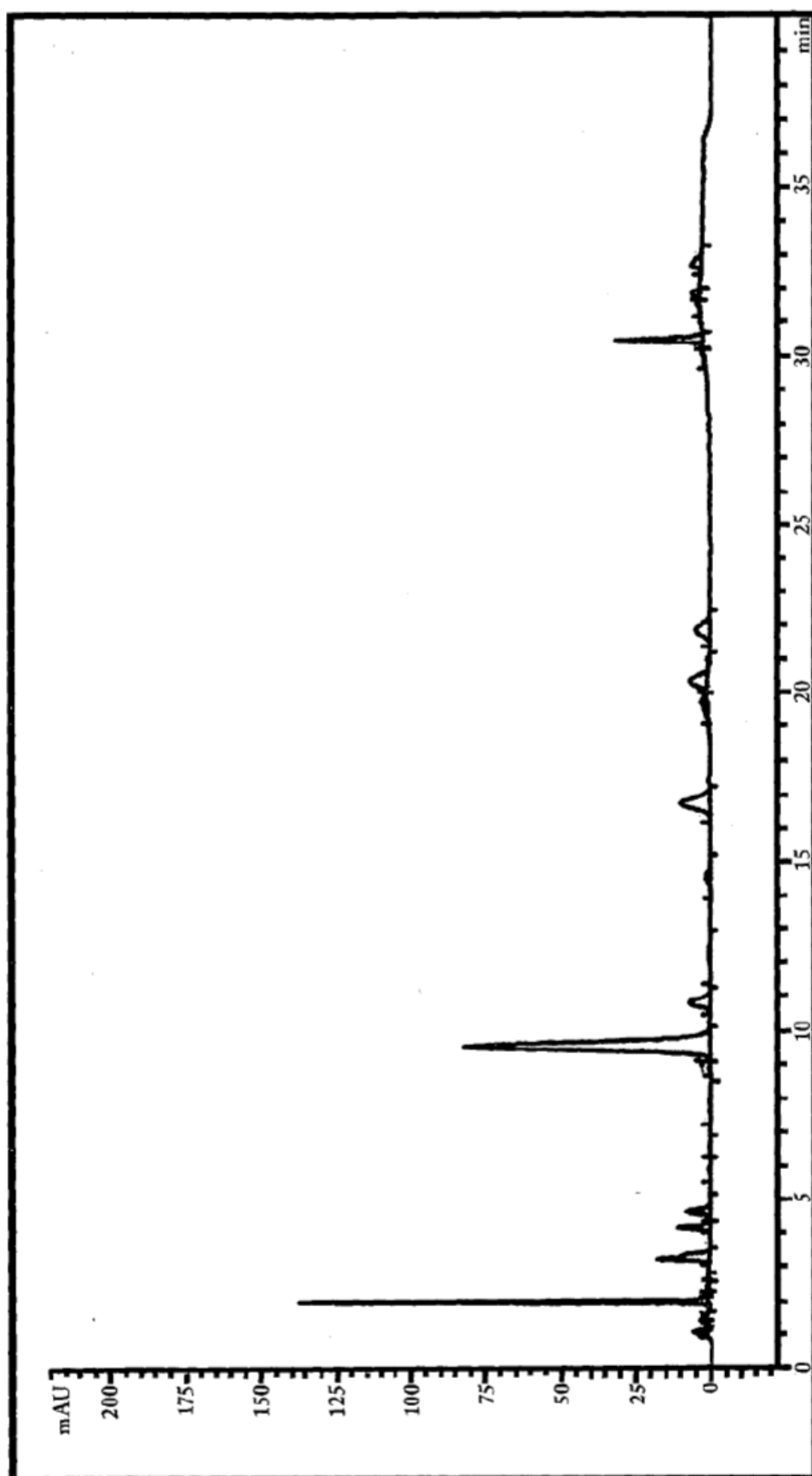
REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), caracterizada porque la composición comprende un extracto purificado 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 picrósido II, 1-10% (p/p) de isovaniloil catalpol y 2-20% (p/p) de 6-O-veratroil catapol, según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.
5
2. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque dicho extracto purificado se caracteriza por ser preparado por el procedimiento de adición de al menos un disolvente de extracción seleccionado entre agua, metanol, etanol, butano o sus mezclas para obtener *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* en el 1er paso; sometiénolo a, al menos, un método de extracción seleccionado de extracción con
10 reflujo con agua caliente, extracción con agua fría, ultra-sonicación o extracción convencional repetidamente, para proporcionar el 1er extracto en el 2º paso; suspender el 1er extracto en 0,5-10 veces el volumen (v/v) de agua para proporcionar un extracto suspendido en el 3er paso; añadiendo 0,5-20 veces el volumen (v/v) de butanol, separando entre una capa de agua y la capa de butanol y recogiendo la capa de butanol para proporcionar un extracto
15 purificado fraccionado con butanol (ATC1) en el 3er paso; y sometiendo el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1) a al menos un procedimiento de purificación seleccionado entre el grupo consistente en cromatografía de partición de fase inversa, cromatografía de partición de fase normal, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaños o una combinación de estos para proporcionar un extracto
20 purificado 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 picrósido II, 1-10% (p/p) de isovaniloil catalpol y 2-20% (p/p) de 6-O-veratroil catapol según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.
3. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, caracterizado porque la composición comprende vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.
4. Un alimento beneficioso para la salud para su uso en el alivio de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), caracterizado porque la composición comprende un extracto purificado 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 picrósido II, 1-10% (p/p) de isovaniloil catalpol y 2-20% (p/p) de 6-O-veratroil catapol según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.
25
5. El alimento beneficioso para la salud para su uso según la reivindicación 4, estando dicho alimento beneficioso para la salud en forma de polvos, gránulos, tabletas, cápsulas, píldoras, suspensiones, emulsiones, jarabes, bolsas de té, blanqueadores de té o bebidas saludables.
30

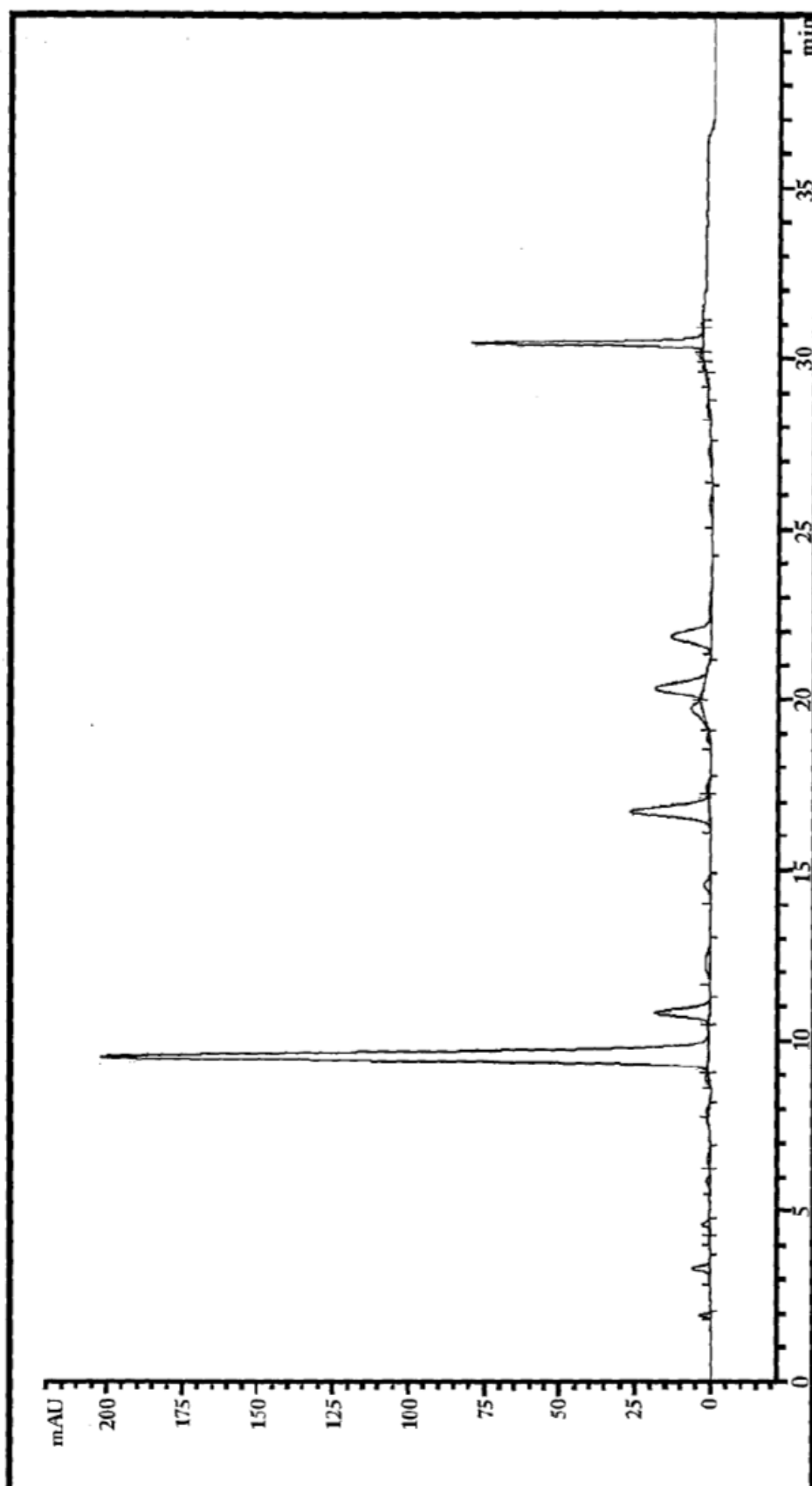
[Fig. 1]



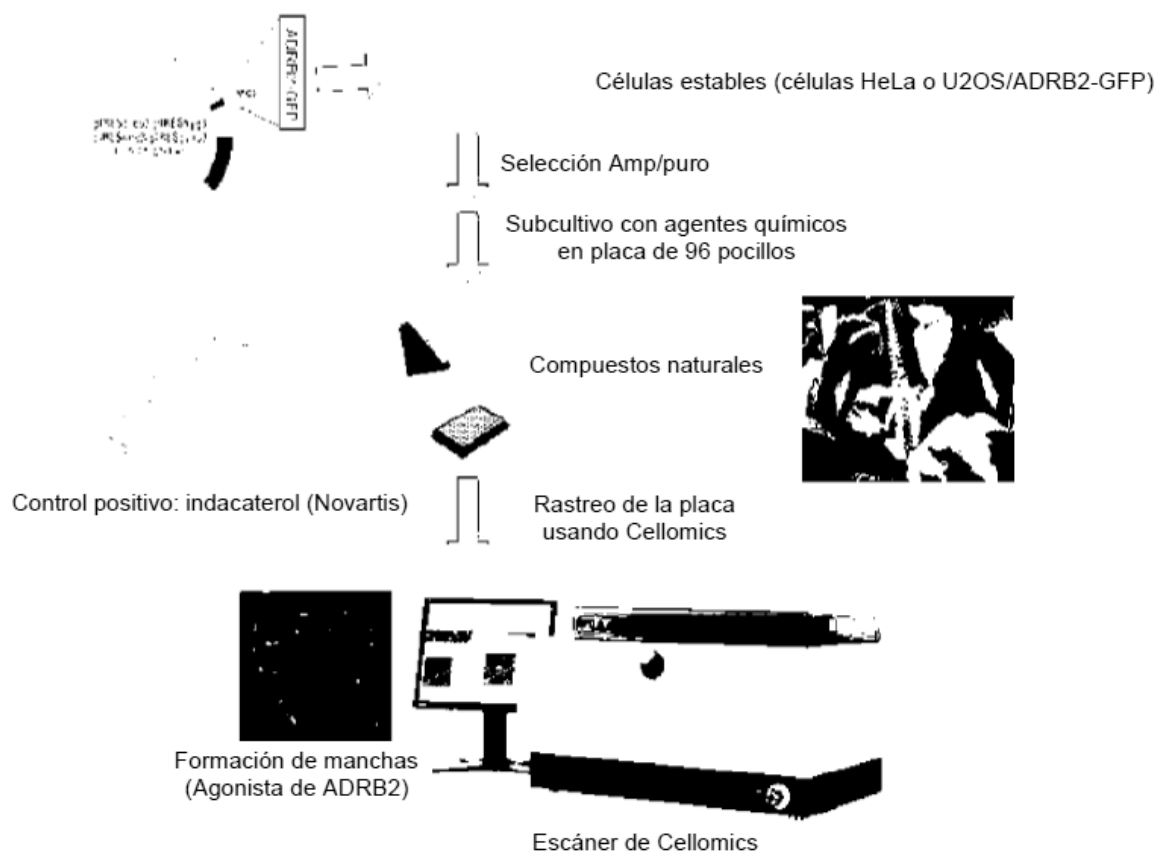
[Fig. 2]



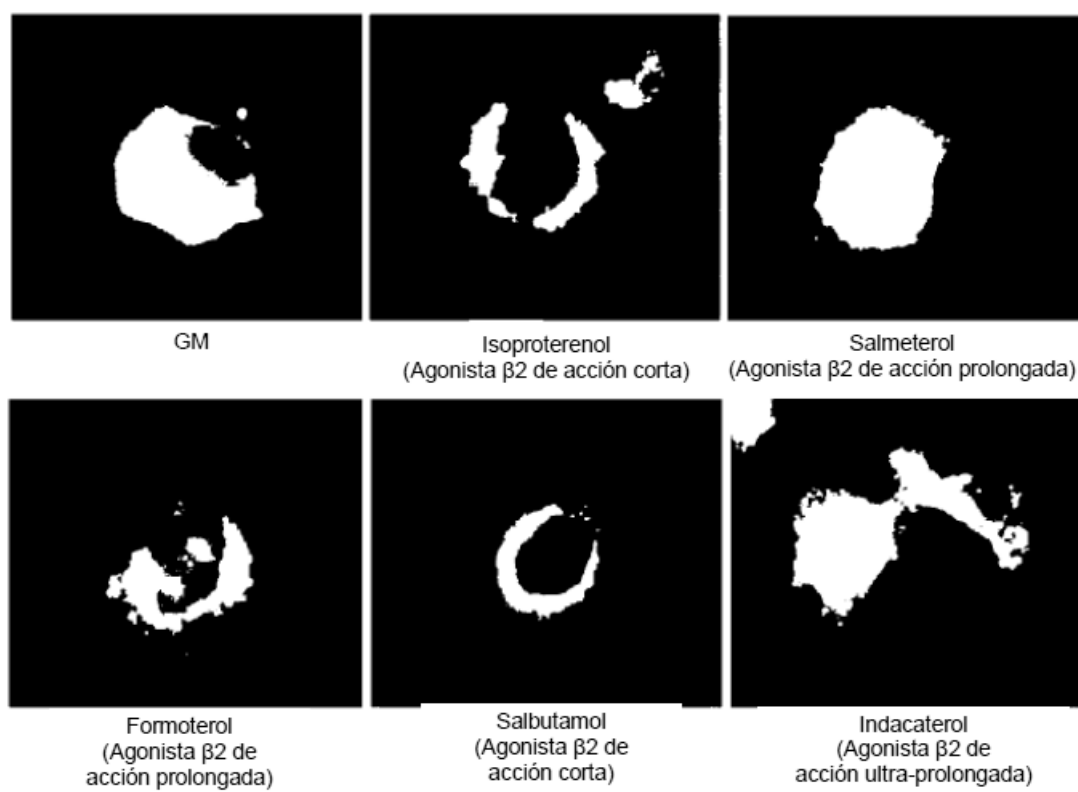
[Fig. 3]



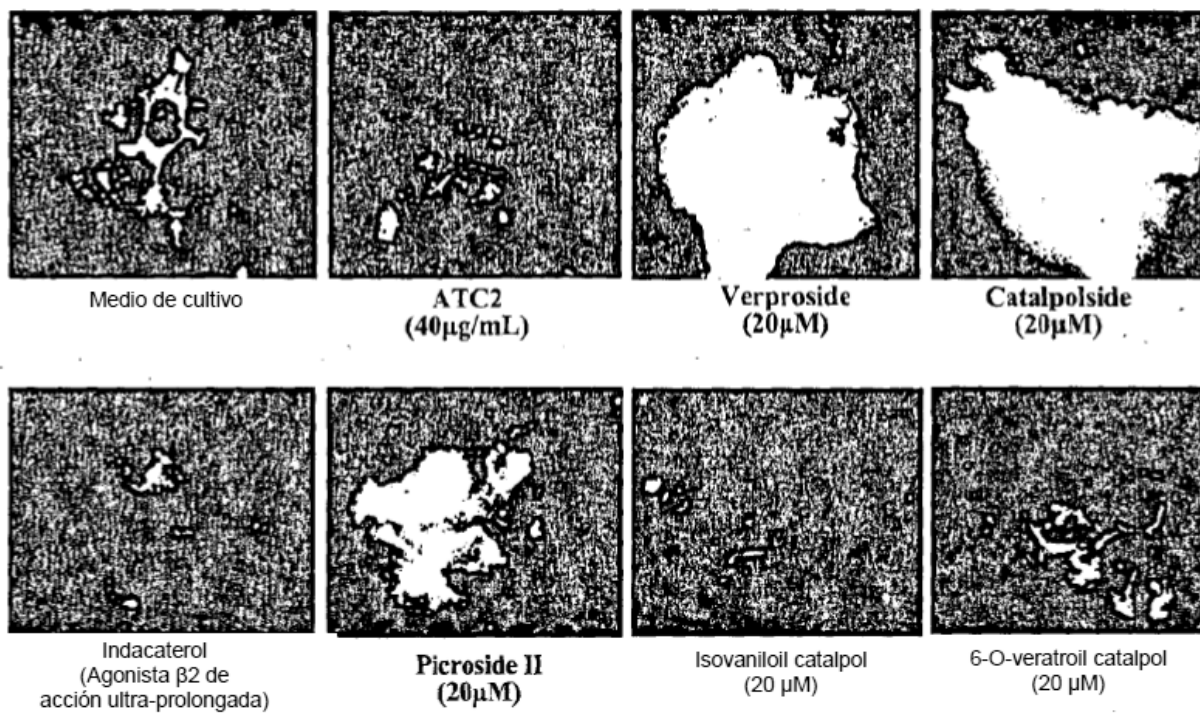
[Fig. 4]



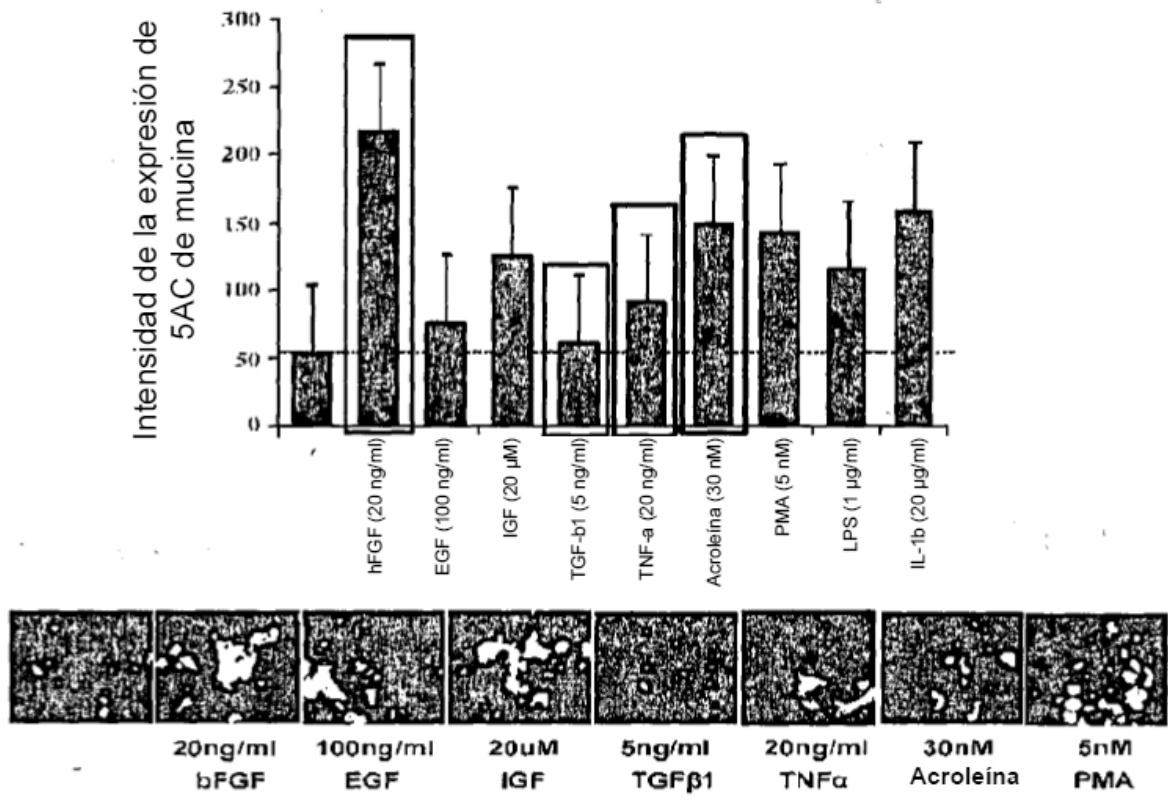
[Fig. 5]



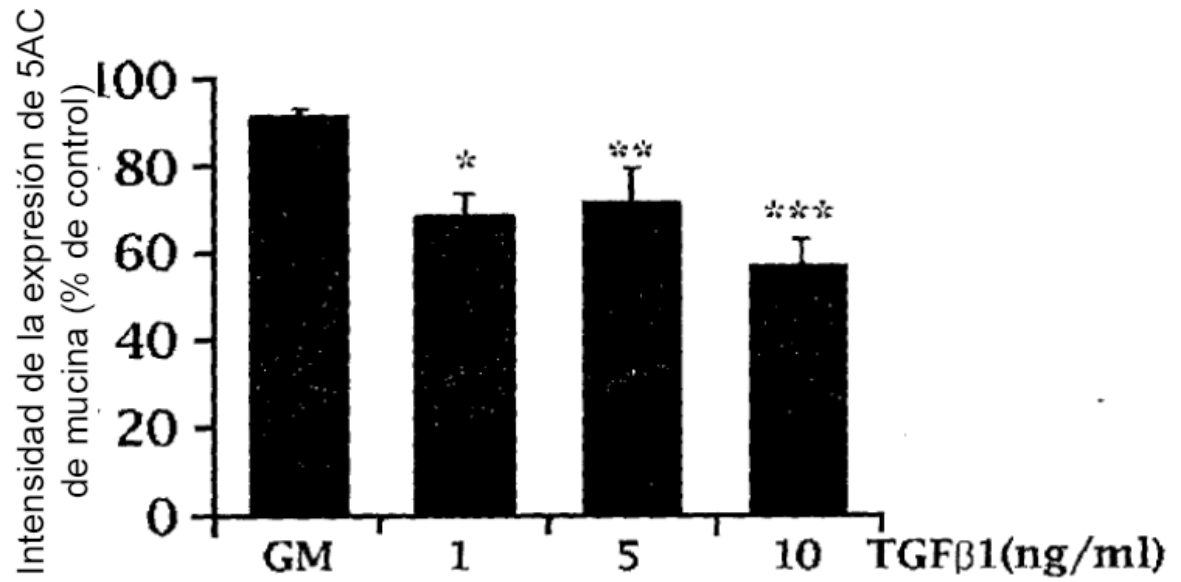
[Fig. 6]



[Fig. 7]



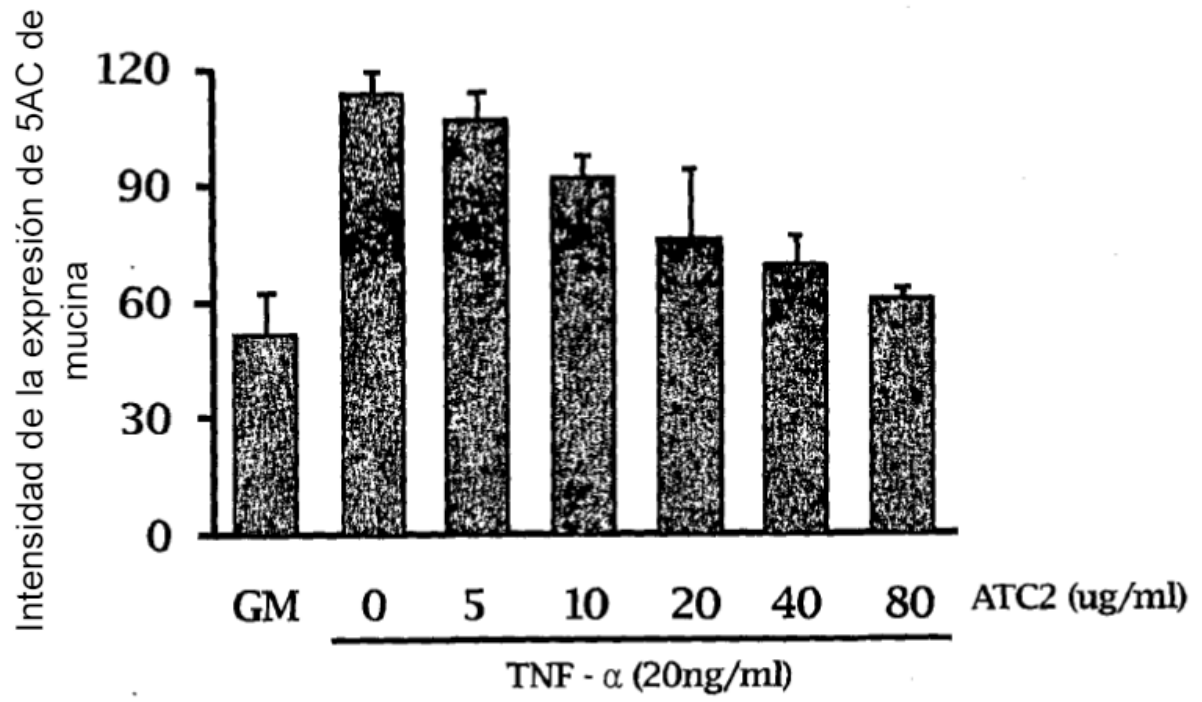
[Fig. 8]



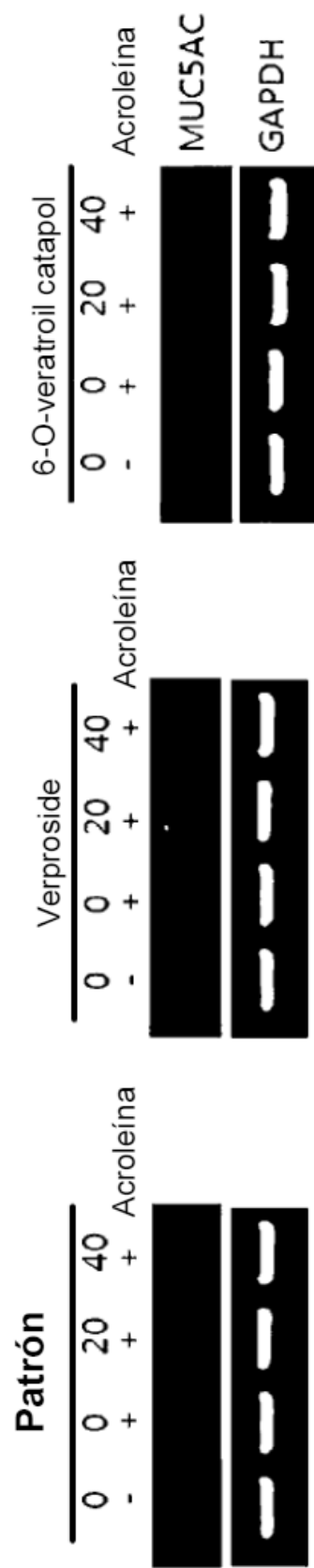
GM

5ng/ml
TGFβ1

[Fig. 9]

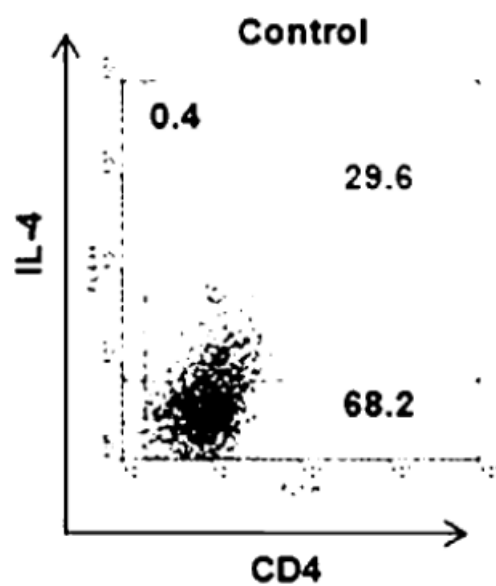


[Fig. 10]

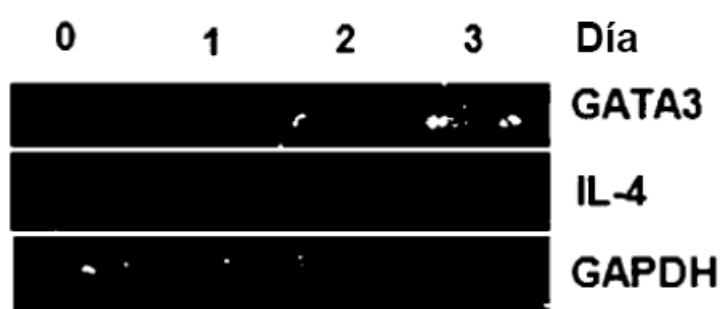


[Fig. 11]

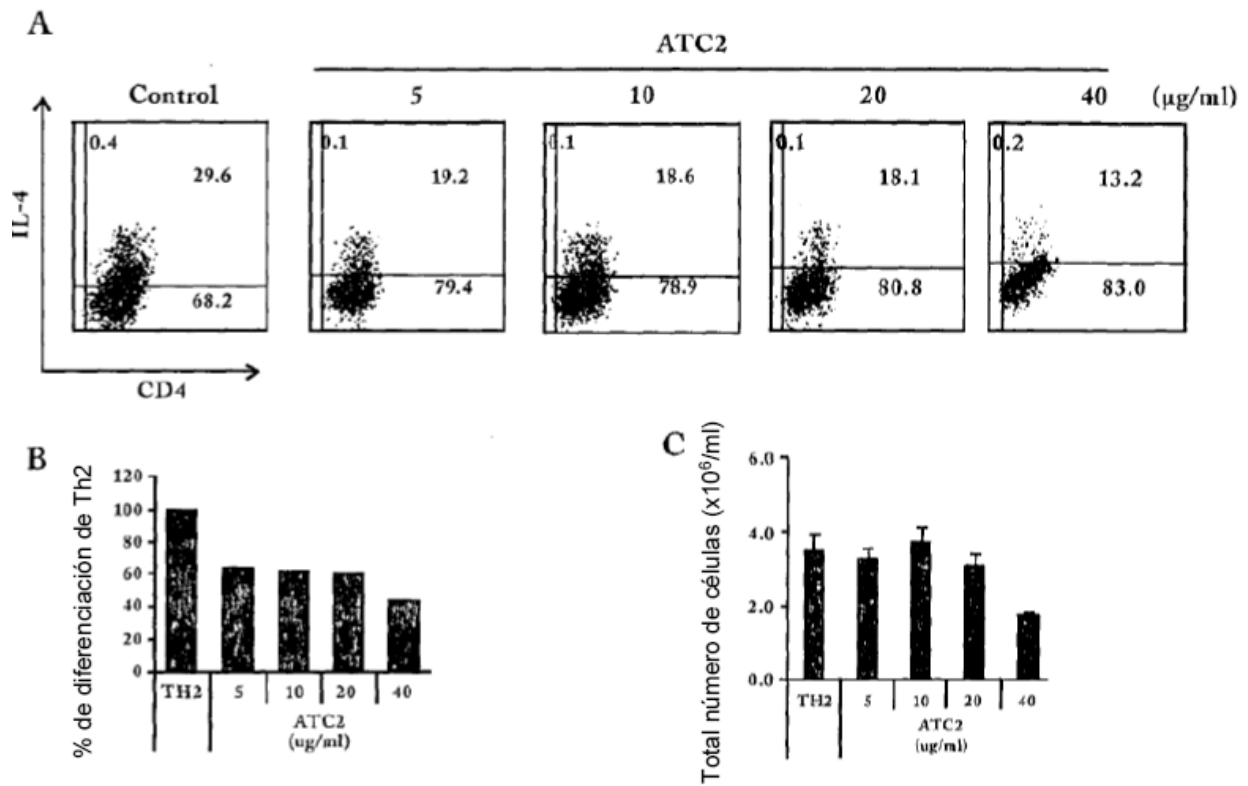
A



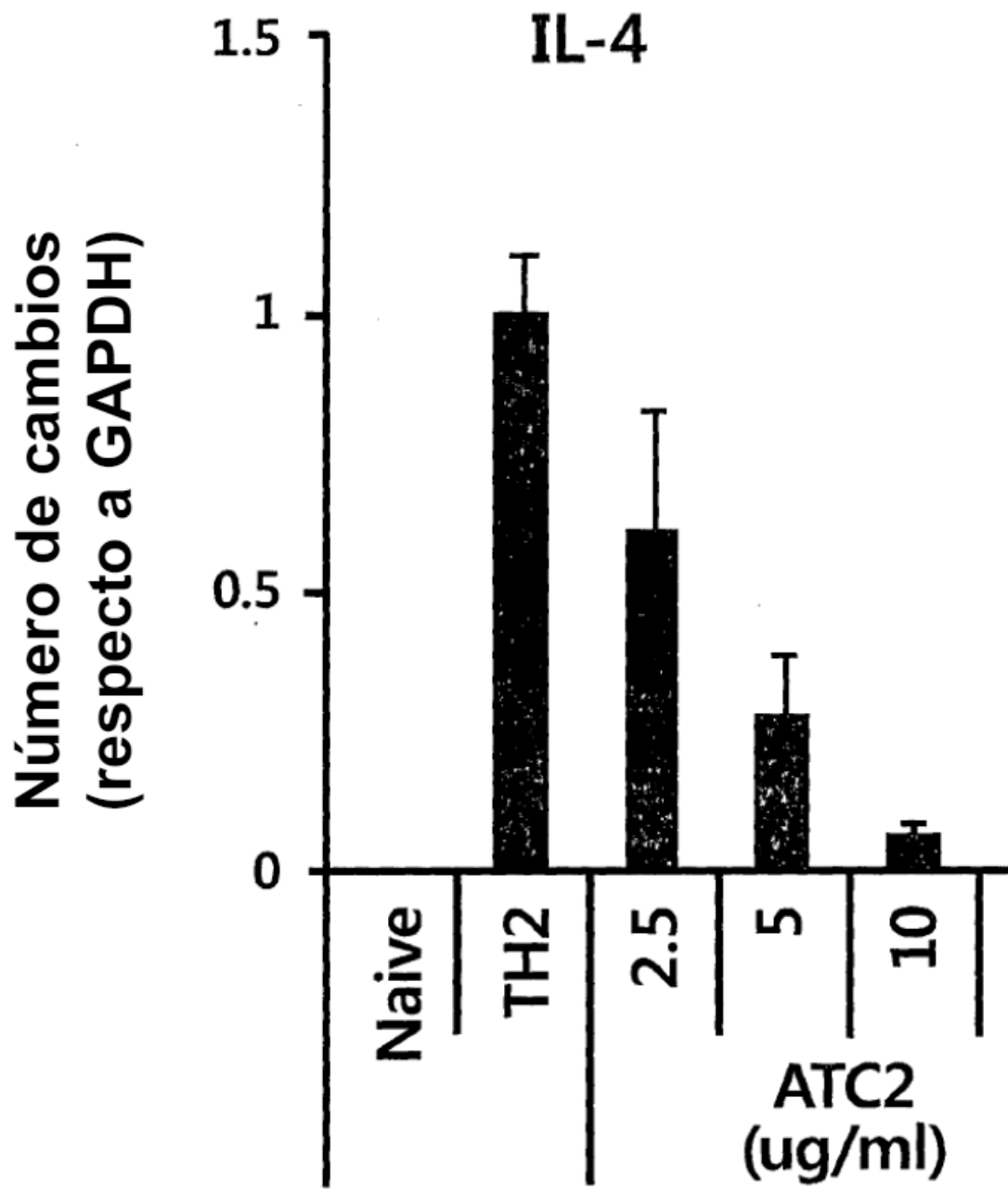
B



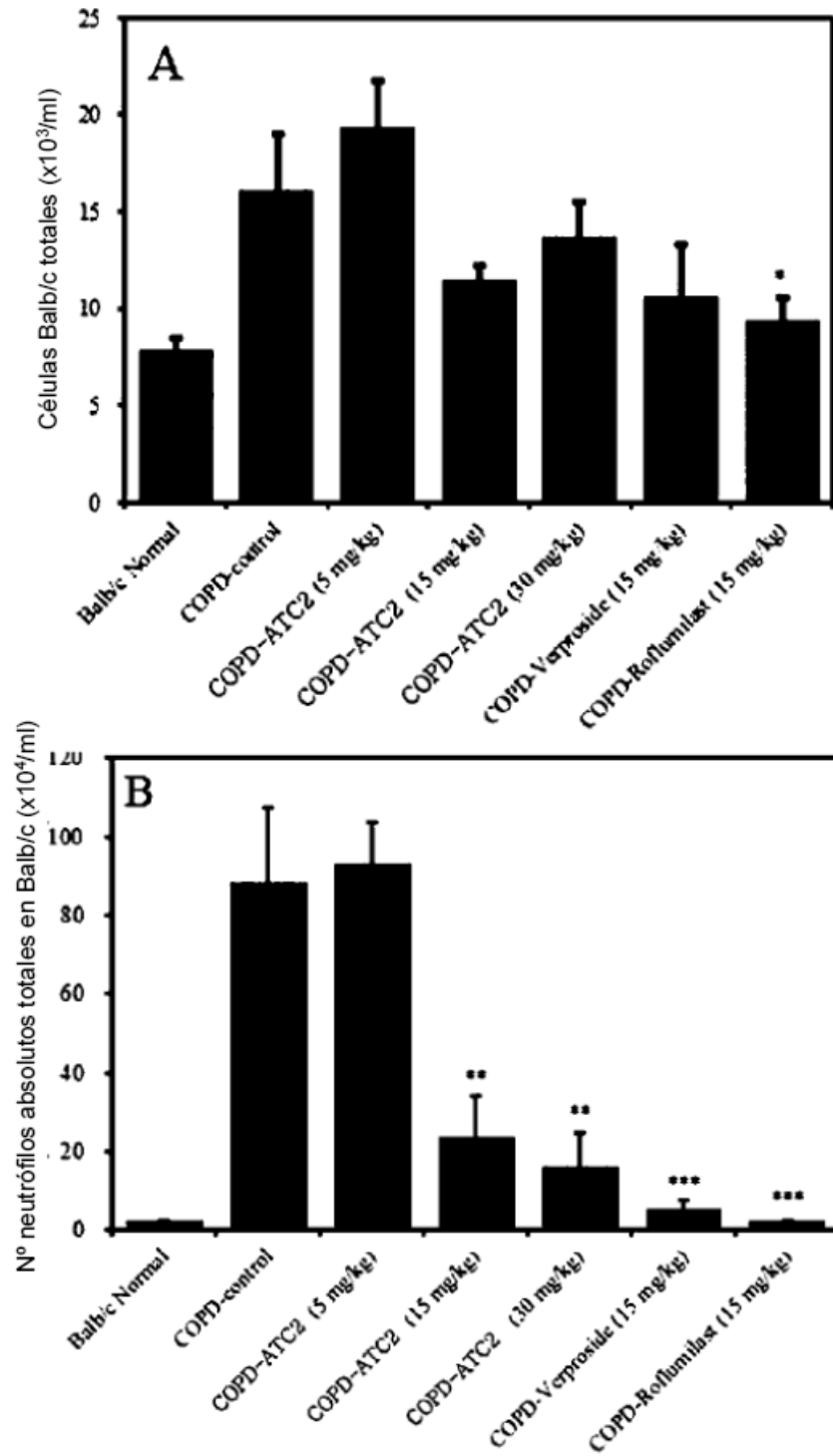
[Fig. 12]



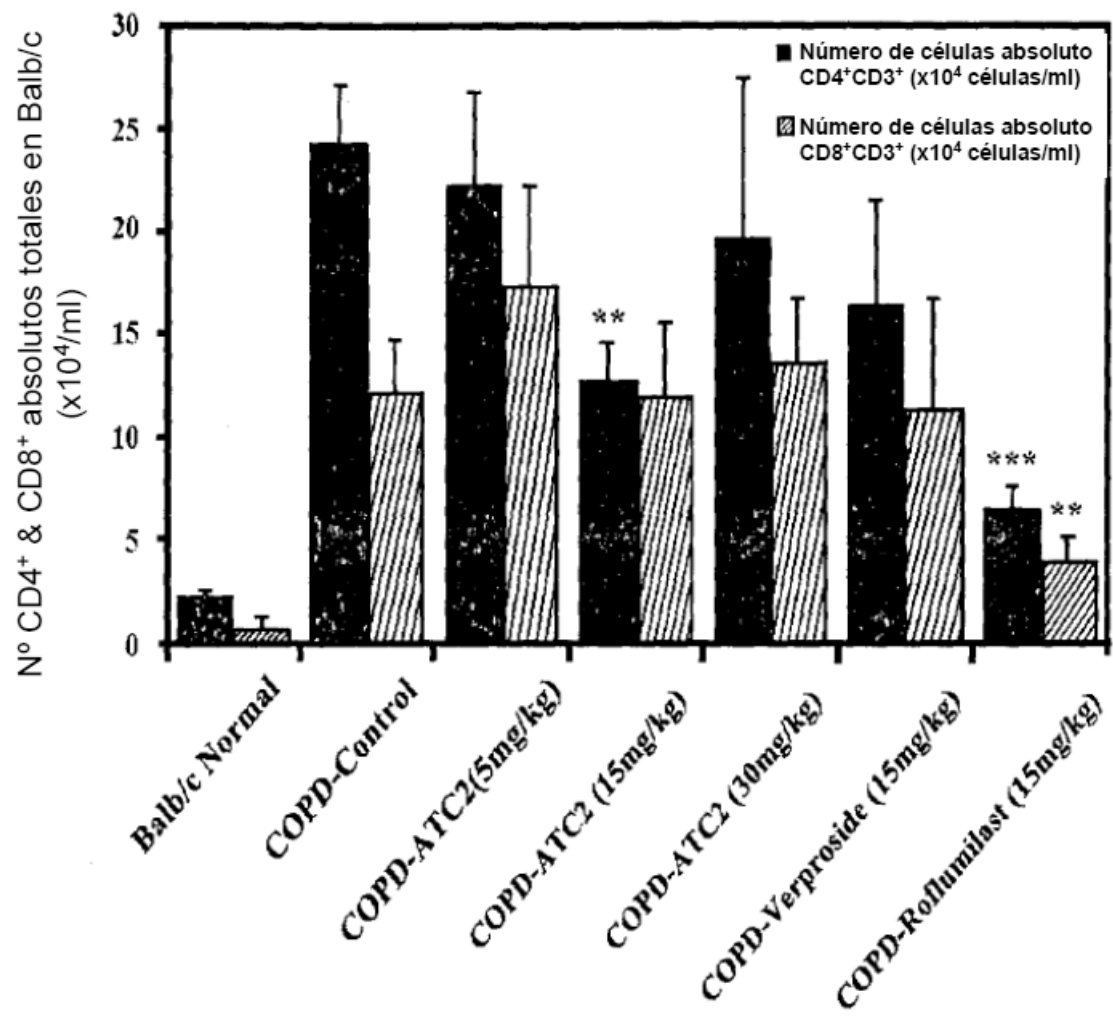
[Fig. 13]



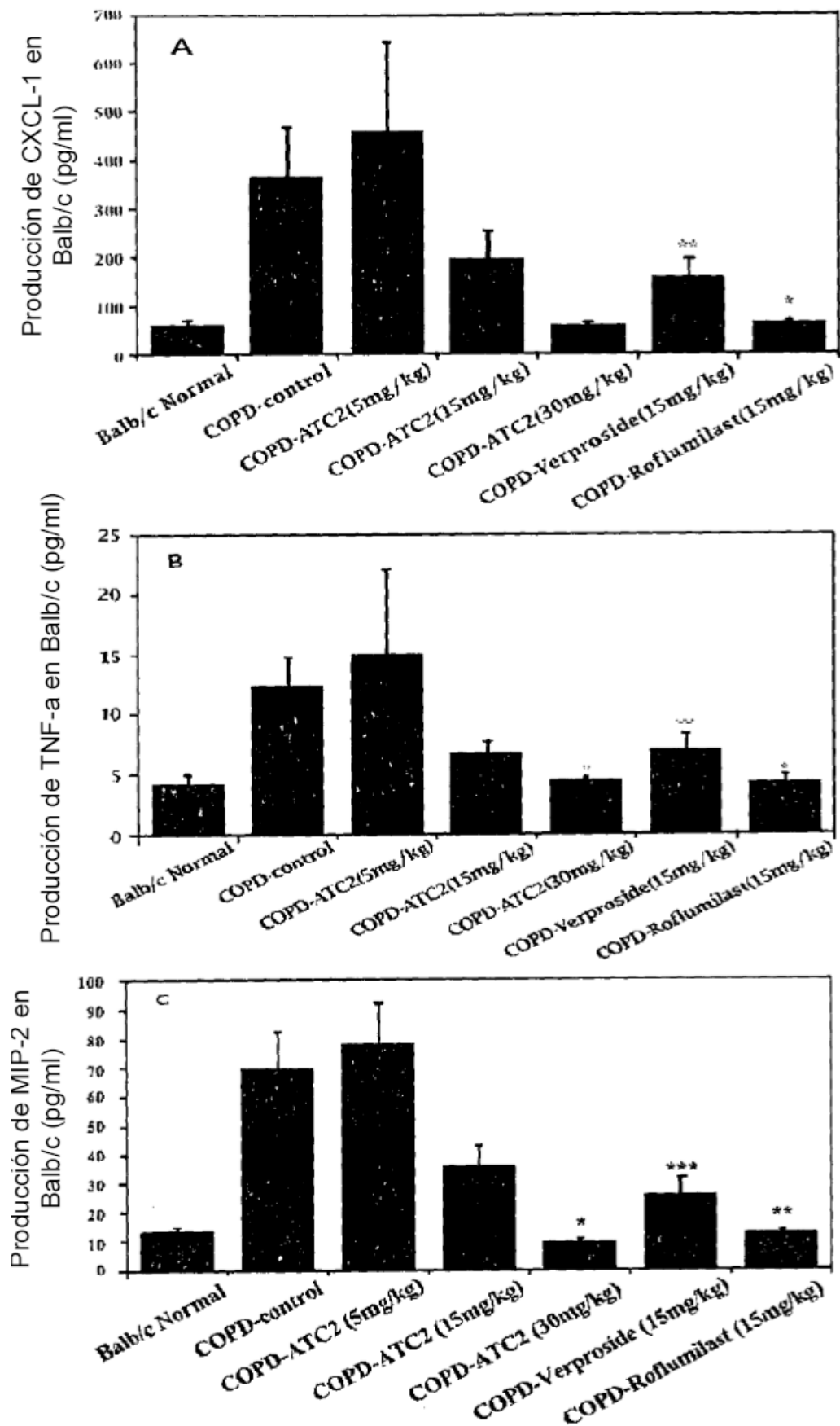
[Fig. 14]



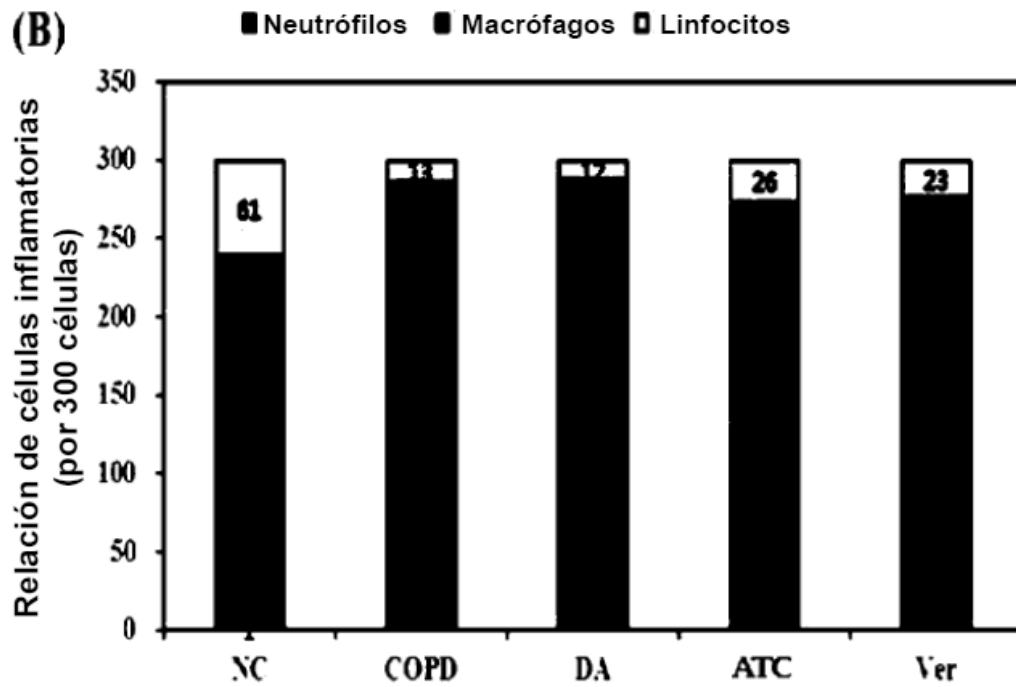
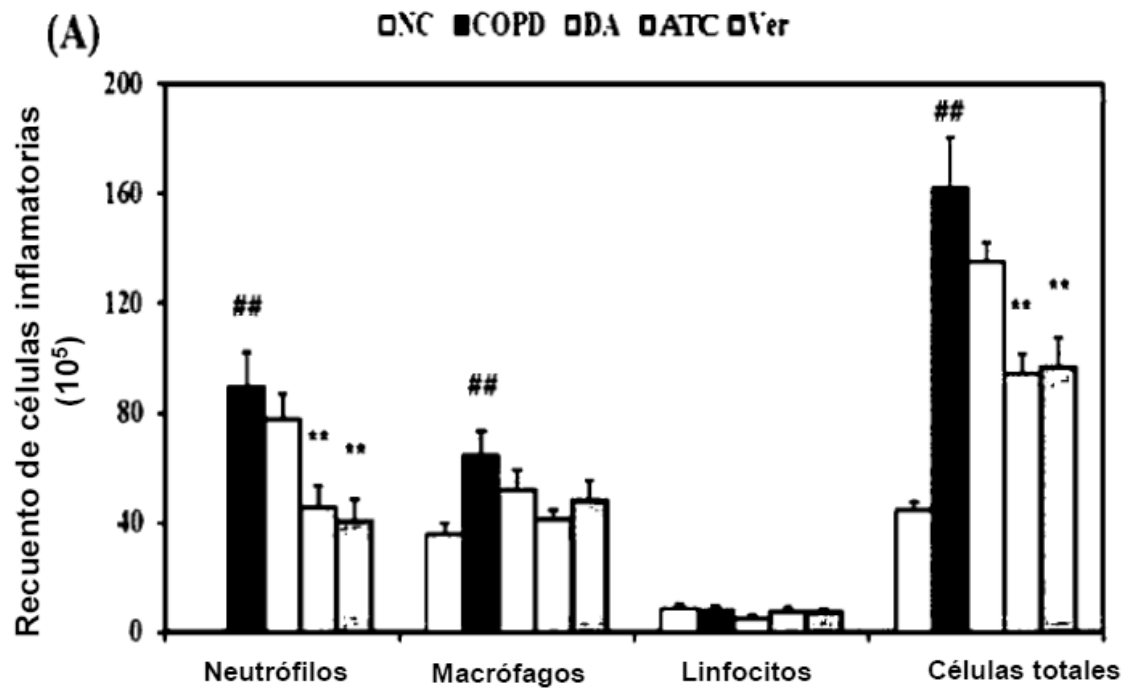
[Fig. 15]



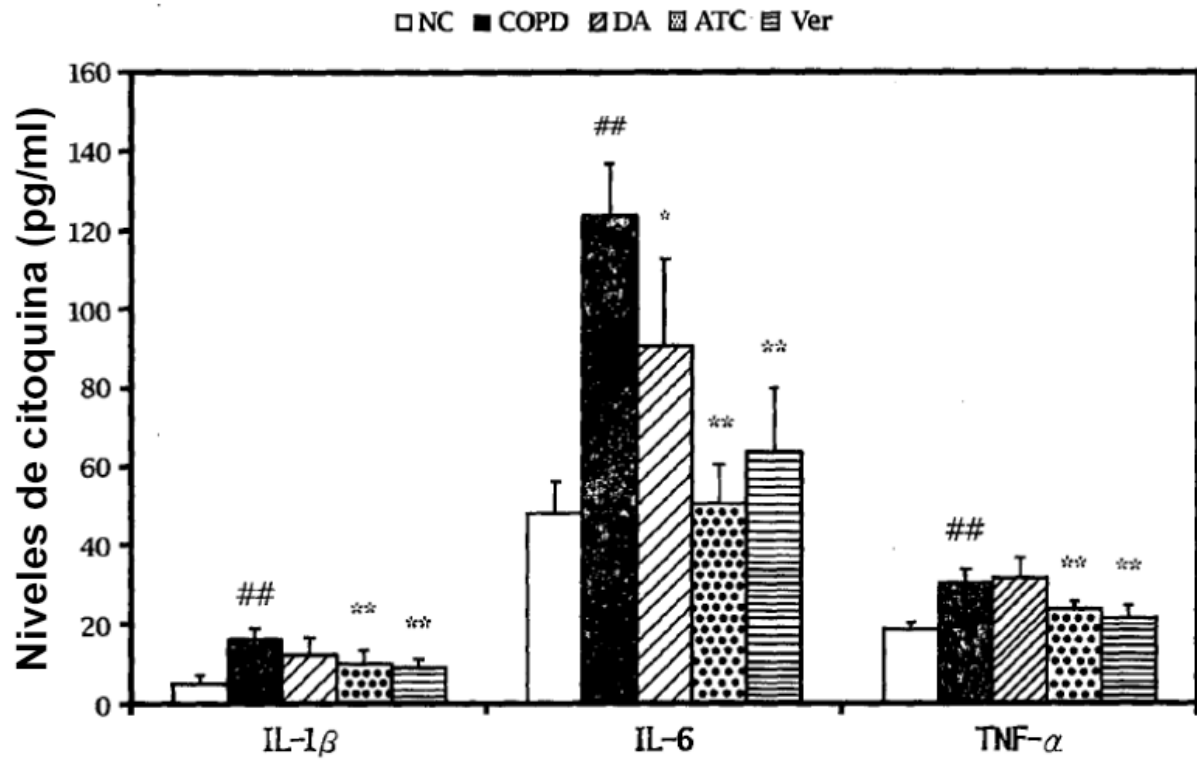
[Fig. 16]



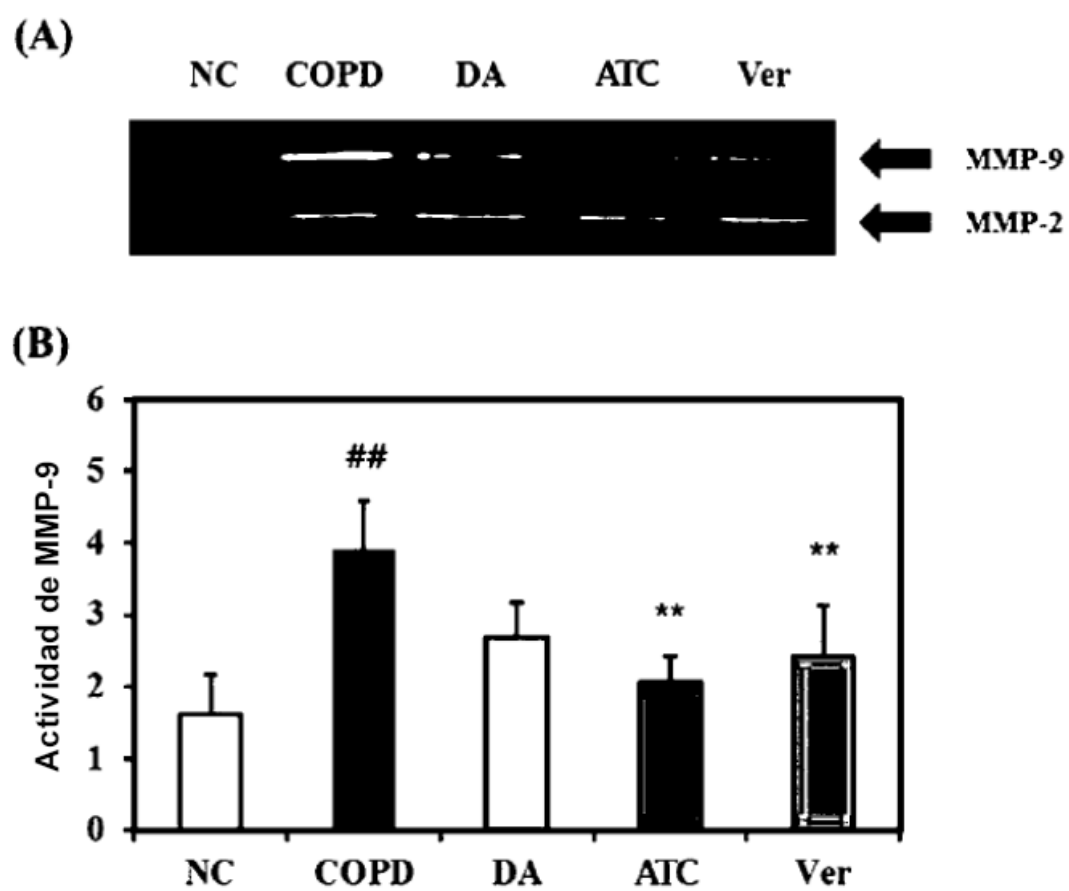
[Fig. 17]



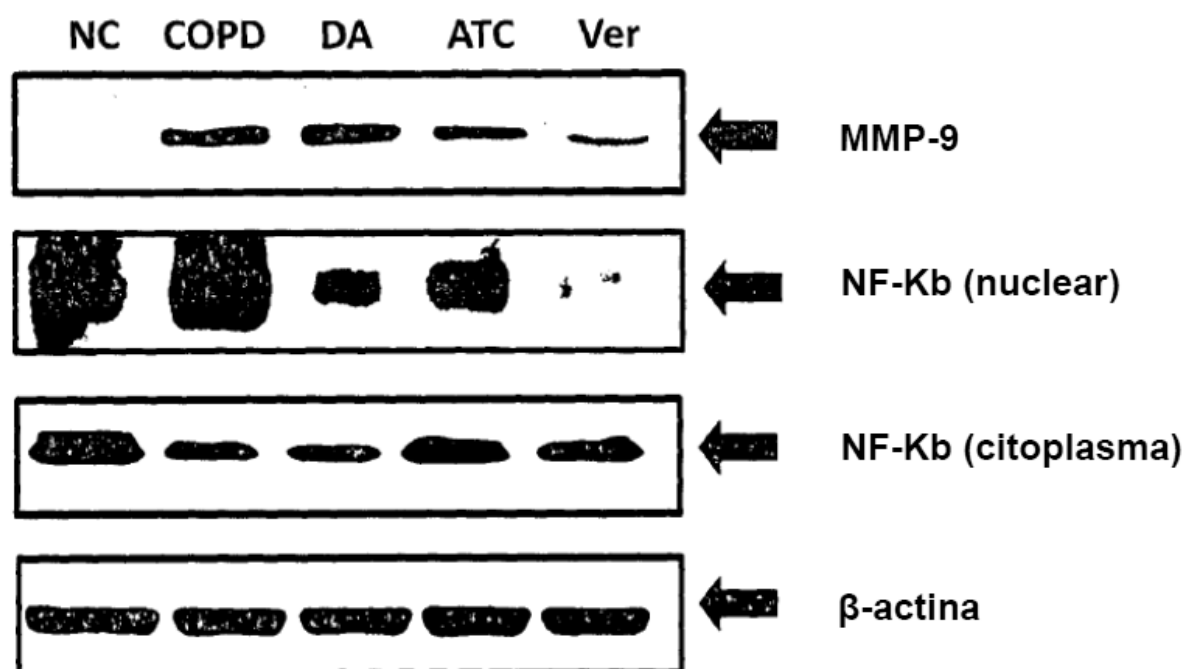
[Fig. 18]



[Fig. 19]



[Fig. 20]



[Fig. 21]

