

(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 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%; 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 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.

40 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+ (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, RENTES, 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 (citolíticos) (Saetta M, di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, MAPP CE, Maestrelli P,

5 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).

10 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 15 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 20 evaluation of emerging anti-inflammatory agents for the treatment of COPD, Current Opinion in Pharmacology, 2009, 9:231-242).

25 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 30 función pulmonar en la EPOC o el desarrollo del asma.

35 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.

40 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), picrósido II (6-o-4-hidroxi-3-metoxibenzoilo Catalpol), verminoside (6-O-3,4-dihidroxi cinamoilo Catalpol), 6-O-veratrolilo 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).

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

50 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.

55 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.

20 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 catapol 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; sometiéndolo, al menos, a un método de extracción seleccionado entre extracción por refluxo 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 catapol, 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 catapol, 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-veratrol catapol, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable del mismo.

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

10 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).

15 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-veratrol 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-veratrol 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-veratrol 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-veratrol 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-veratrol catapol.

20 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,

25 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-veratrol catapol, según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* para tratar y prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9

- 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 picrósido II, 0,3-10% (p/p) de isovaniloil catalpol y 0,3-10% (p/p) catapol 6-O-veratrol, según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* para tratar y prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).
- 10 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 picrósido II, 1-10% (p/p) de isovaniloil catalpol y 2-20% (p/p) de 6-O-veratrol 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 picrósido II, 2-8% (p/p) de isovaniloil catalpol y 3-8% (p/p) de 6-O-veratrol 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 picrósido II, 1,10-1,40 partes (p/p) de isovaniloil catalpol y 2,00-2,20 partes (p/p) de 6-O-veratrol 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 picrósido II, 1,20-1,35 partes (p/p) de isovaniloil catalpol y 2,00-2,10 partes (p/p) de 6-O-veratrol 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 picrósido II, 1,25-1,34 partes (p/p) de isovaniloil catalpol y 2,01-2,09 partes (p/p) de 6-O-veratrol catapol.
- 25 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 sometiendo el extracto purificado fraccionado con butanol (ATC1)
- 30 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 picrósido II, 1-10% (p/p) de isovaniloil catalpol y 2-20% (p/p) de 6-O-veratrol catapol según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* para tratar o prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).
- 35 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
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

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 picrósido II, 1-10% (p/p) de isovaniloil catalpol y 2-20% (p/p) de 6-O-veratrol catapol según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* para tratar o prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

10 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.

25 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.

35 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.

40 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.

45 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.

50 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 reticulación 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)methyl-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 picrósido II, 0,3-10% (p/p) de isovaniloil catalpol y 0,3-10% (p/p) de 6-O-veratroyl 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 picrósido II, 0,5-5% (p/p) de isovaniloil catalpol y 1-5% (p/p) de 6-O-veratroyl 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 picrósido II, 1,00-1,30 partes (p/p) de isovaniloil catalpol y 2,00-2,30 partes (p/p) de 6-O-veratroyl catapol; preferiblemente, 16,0-17,0 partes (p/p) de verprósido, 2,20-2,50 partes (p/p) 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-veratroyl 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 picrósido II, 1,10-1,19 partes (p/p) de isovaniloil catalpol y 2,10-2,19 partes (p/p) de 6-O-veratroyl 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 picrósido II, 1-10% (p/p) de isovaniloil catalpol y 2-20% (p/p) catapol 6-O-veratroyl, 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 picrósido II, 2-8% (p/p) de isovaniloil catalpol y 3-8% (p/p) de 6-O-veratroyl 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)

5 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 picrósido 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 picrósido 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 picrósido II, 1,15-1,24 partes (p/p) de isovaniloil catalpol y 2,01-2,09 partes (p/p) de 6-O-veratroil catapol.

10 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.

15 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.

20 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 picrósido 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 picrósido II, 3,85% (p/p) de isovaniloil catalpol y 6,15% (p/p) de 6-O-veratroil catapol, 25 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 picrósido 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 30 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 inmunicitos 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 (quimiocinas 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 35 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.

40 Los actuales inventores también han encontrado que la relación en peso combinada maximizada entre el ácido verátrico, el verprósido, el catalpósido, el picrósido 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), picrósido 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).

50 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% 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 tratar o prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

55 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% 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 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, picrósido II, isovaniloil catalpol y 6-O-veratrol 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, picrósido II, isovaniloil catalpol y 6-O-veratrol 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, picrósido II, isovaniloil catalpol y 6-O-veratrol 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, 7^a 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 efectiva 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, picrósido II, isovaniloil catalpol y 6-O-veratrol catapol en un mamífero que sufre de pulmonar obstructiva crónica enfermedad (EPOC).

25 La presente descripción también proporciona

30 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, picrósido II, isovaniloil catalpol y 6-O-veratrol 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% picrósido II, 1,0-15% isovaniloil catalpol y 2,0-25% 6-O-veratrol 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-veratrol 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% picrósido II, 1,0-15% isovaniloil catalpol y 2,0-25% 6-O-veratrol 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-veratrol 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, picrósido II, isovaniloil catalpol y 6-O-veratrol 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% picrósido II, 1,0-15% isovaniloil catalpol y 2,0-25% 6-O-veratrol 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-veratrol 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, esteárate de magnesio y aceite mineral. Las formulaciones pueden incluir, además, rellenos, agentes anti-aglutinantes, agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes aromatizantes, emulsificantes, conservantes, etc. 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.

10 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.

15 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).

20 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.

25 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.

30 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.

35 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-veratrol para la prevención o el alivio de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

40 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-veratrol 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-veratrol catapol para la prevención o el alivio de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

45 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.

50 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-veratrol catapol, junto con un aditivo fitológicamente aceptable para la prevención o el alivio de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

55 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.

5 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.

20 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.

35 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.

45 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 levaudiosidea, la gliciricina, 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.

55 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 péptico y sus sales, el ácido algínico 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, 5 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 10 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-veratrol 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; 15 una prueba de la inhibición de la reproducción de quimoquinas 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 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, 20 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 25 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 ± 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) x At/As x 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 µm	
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 (%)
	0 ~ 5	80
		Fase móvil B (%)
		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-veratrol 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-veratrol 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-veratrol 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-veratrol 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-veratroyl 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-veratroyl 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 isovaniliil catalpol, y 6,15% (p/p) de 6-O-veratroyl 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-veratroyl 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-veratroyl 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 nº 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-*d*₆) 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 ^{13}C -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. picrósido 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 ^{13}C -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 ^{13}C -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)catalpol)

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).

35 ^{13}C -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-veratrolil catalpol (= 6-O-(3,4-dimetoxibenzoil)catalpol)

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).

45 ^{13}C -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

Fue clonado ADBR2 (receptor adrenérgico beta-2) GPCR (receptor acoplado a proteínas G, Sinco Biological Inc., HF10378-M) en el vector pIRESpuro (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.

50 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 confirmado 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 hipototasemia, 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

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): 1392-403, 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, 12:173-26).

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-1beta. 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-beta1, aumentaron la expresión de MUC5A/C.

50 2-2. Digitalización del efecto inhibidor del TGF-beta 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 inhibidor del TNF-alfa en la expresión de 5A/C de mucina

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 Cellomics.

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 MUC5AC de una manera dependiente de la dosis en el caso de que ATC2 se trataba con anterioridad.

10 2-4. Efecto inhibidor 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 (4×10^5 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 (Dietilpirocárbonato, 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, desnaturalizado 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-veratrol 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 bazos de ratones C57BL6 que se usaban por MACS (Miltenyi Biotec, nº. 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 Millipore, 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 atípicos (CD4⁺CD62L⁺Miltenyi Biotec, 130-093-227) de los ganglios linfáticos y los bazos de ratones C57BL6 que utilizaban MACS (Miltenyi Biotec, nº. 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 atípicos (CD4⁺CD62L⁺Miltenyi Biotec, 130-093-227) de ganglios linfáticos y bazos 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 atípicos 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-a, 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-a, 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

45 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 µg/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)

- 5 • material de prueba: se utilizaron 60 piezas de cigarrillo estándar CM7 (Coresta Monitering 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

10 El humo convencional de cigarrillos estándar CM7 (Coresta Monitering 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, KFDA) y se realizaba en la sala de fumadores (Temp.: $22 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa: $60 \pm 5\%$).

15 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).

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

25 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, KFDA).

Como consecuencia, se confirmó que el contenido de TPM, en el caso de que el cigarrillo estándar se combusione 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.

30 (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.

35 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>

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

40

donde TPM indica la materia particulada total;

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

45 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-verprósido), (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 500µl 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 colagenasa 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 immunofluorescencia 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-1 β , IL-6, TNF-a, IL-17, MCP-1 y GRO-a (BioSource, EE.UU.) en BALF aislado de ratones fue determinado por el ensayo de inmunoadsorbente ligado a enzimas. Los anticuerpos respectivos contra L-1 β , IL-6, TNF-a, IL-17, MCP-1 y GRO-a 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^B(CS-105B, Tel-Test, EE.UU.). Se añadieron 50 mL de cloroformo (CHCl_3) 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 desnaturalizó 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, Progmea, EE.UU.), 4,5 mL de tampón 5 × RT (M531A, Promega, EE.UU.) y Tris-HCl 250 mM (pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl_2 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.). CATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG (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' tggagcaacatgtggactc 3'
	Inverso	5' ctgccgtacaactccagtga 3'
MUC5AC	Directo	5' AGAATATCTTCAGGACCCCTGCT 3'
	Inverso	5' ACACCAGTGCTGAGCATACTTT 3'

40

(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 ± 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 ± 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).

35 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

40 El número de neutrófilos teñidos con Diff-Qick 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.

45 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.

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

Varias quimioquinas 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).

55 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 quimioquinas 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 quimioquinas MIP-2/CXCL-2, TNF- α , KC/CXCL-1 (quimioquinas Gro- α) y CXCL-8, etc. involucradas en la destrucción de células pulmonares, dando como resultado una potente actividad anti-EPOC.

25 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-1beta, IL-6, TNF- α , la activación de MMP-9, la expresión de proteínas proinflamatorias tales como MMP-9, NF-kB, 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

40 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).

45 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 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 pelete 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 centrífuga 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-1β, 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 µg/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 destilado {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 µg/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 ¹⁷ 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
Esterato 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
Esterato 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-veratrol catalpol	1000 mg
Ácido cítrico	1000 mg
Oligosacárido	100 g
Concentración de albaricoque	2 g
Taurina	1 g
Agua destilada	900 ml

10

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

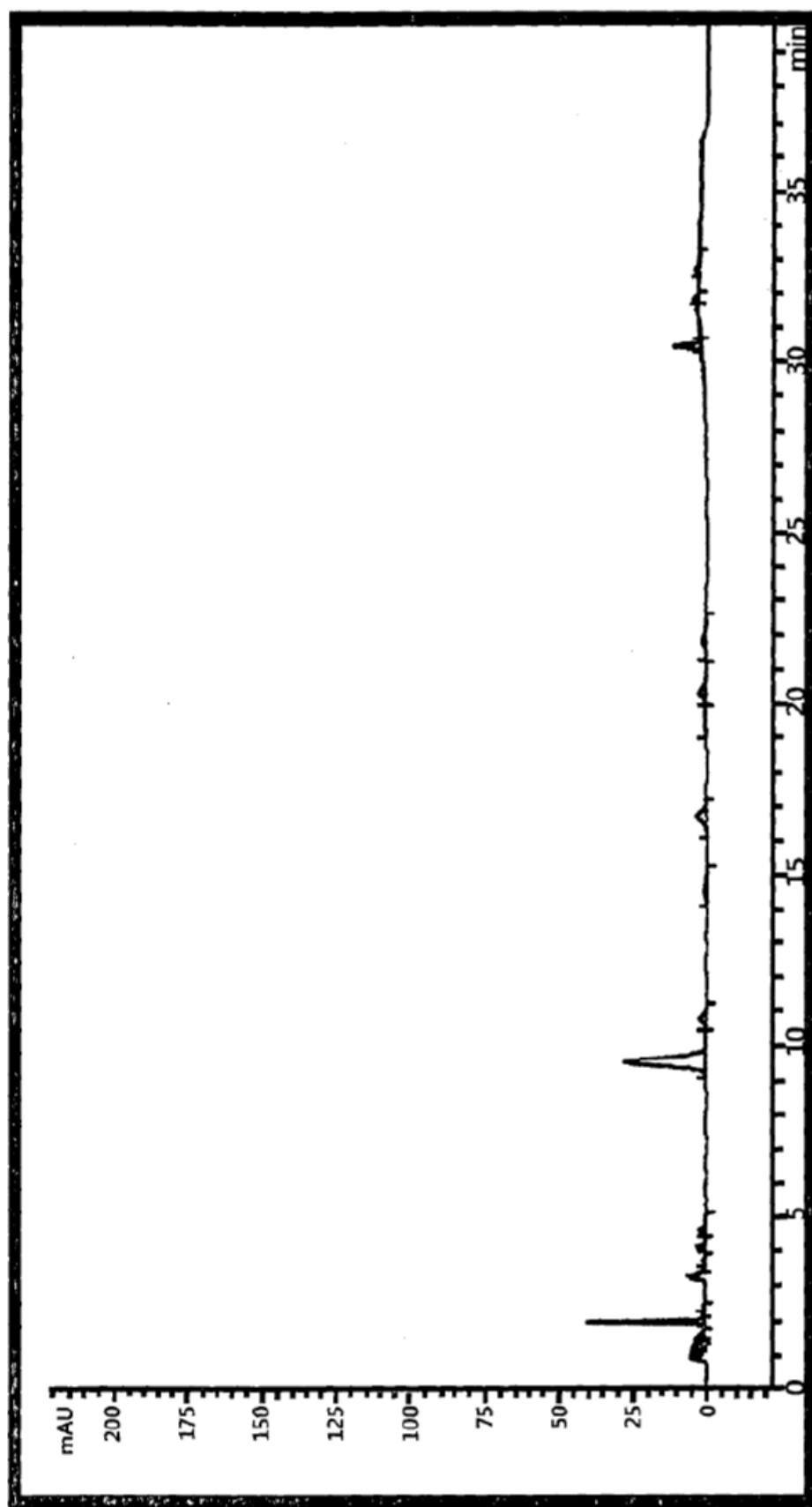
Como se describió anteriormente, el extracto purificado que contenía abundantes ingredientes activos, tales como los derivados de catalpol del extracto de *Pseudolysimachion rotundum var subintegrum* o, al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo constituido por ácido verátrico, verprósido, catalpósido, picrósido II, isovaniloil

- 5 catalpol y 6-O-veratroyl 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 inmunicitos 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 10 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 15 prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

REIVINDICACIONES

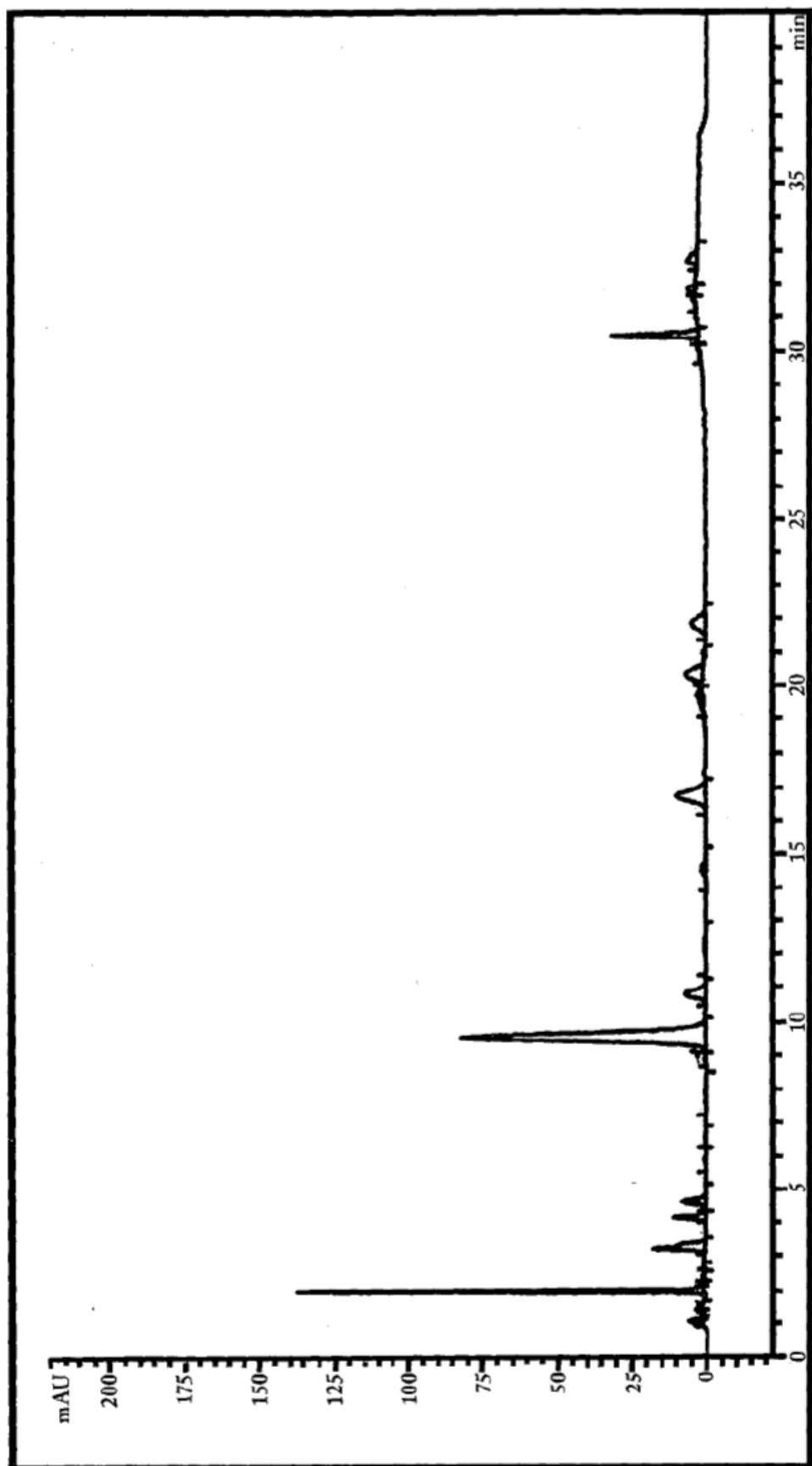
- 5 **1.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), caracterizada porque la composición comprende un extracto purificado que contiene 30-60% (p/p) de verprósido, 0,5-10% (p/p) de ácido verátrico, 2-20% (p/p) de catalpósido, 1-10% (p/p) de picrósido II, 1-10% (p/p) de isovaniloil catalpol y 2-20% (p/p) de 6-O-veratrol catapol, según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.
- 10 **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; 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 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 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 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-veratrol catapol según el peso del extracto total (100%) de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*.
- 15 **3.** La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, caracterizado porque la composición comprende vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 20 **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) picrósido II, 1-10% (p/p) de isovaniloil catalpol y 2-20% (p/p) de 6-O-veratrol 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.

[Fig. 1]

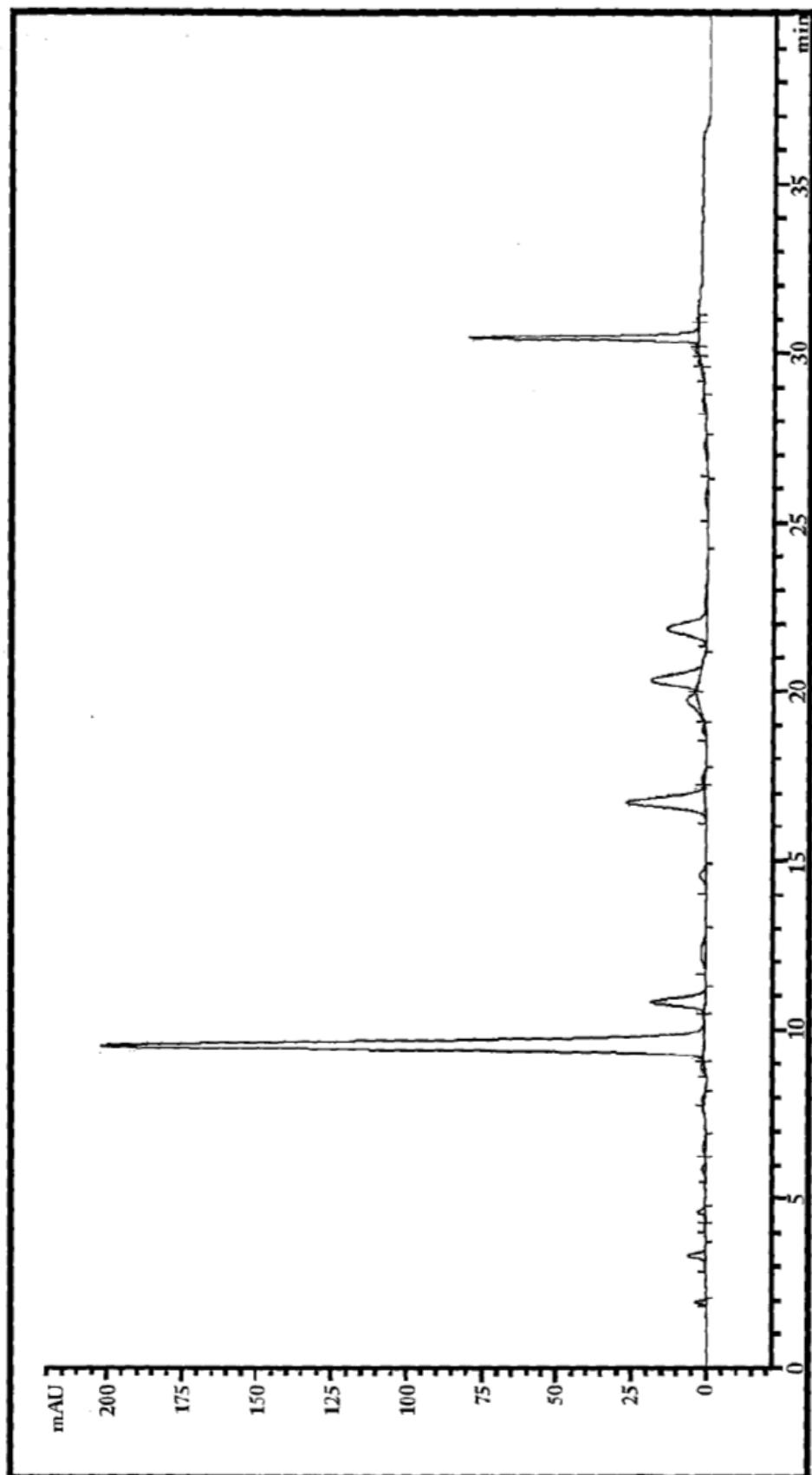


ES 2 728 548 T3

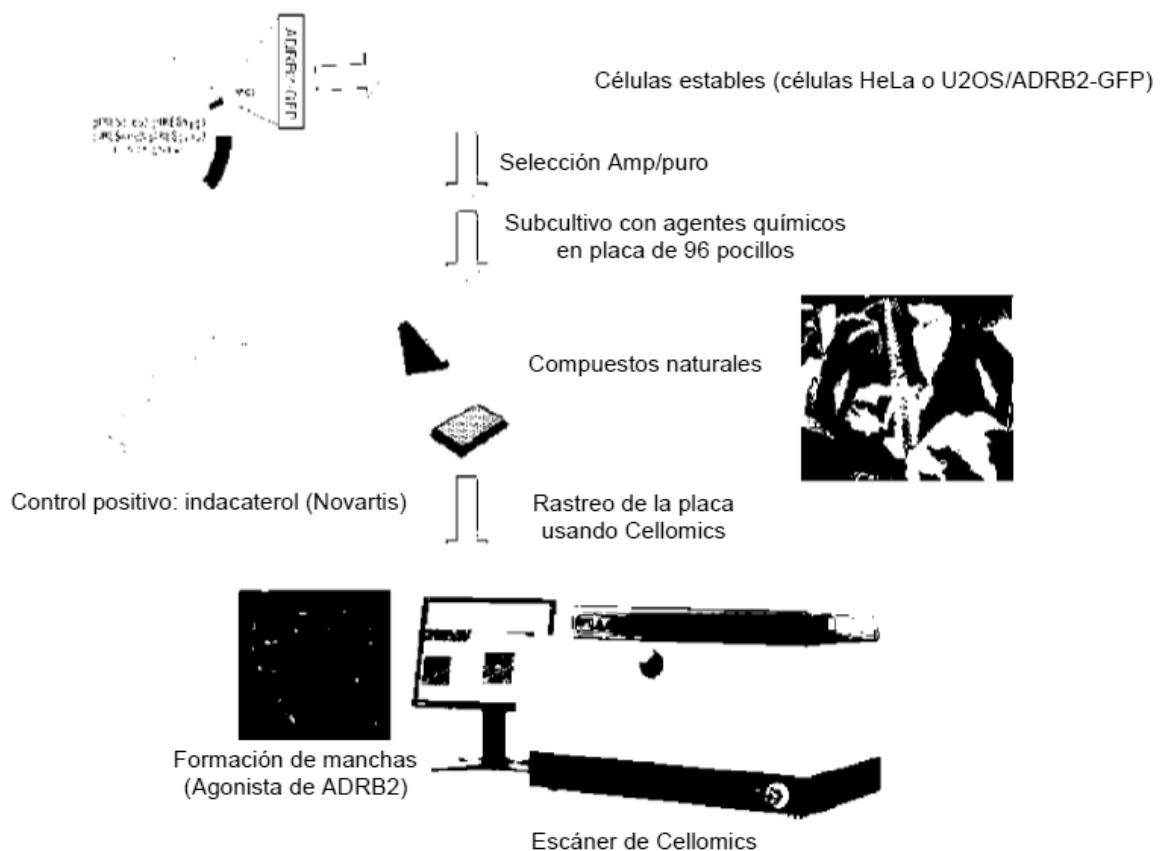
[Fig. 2]



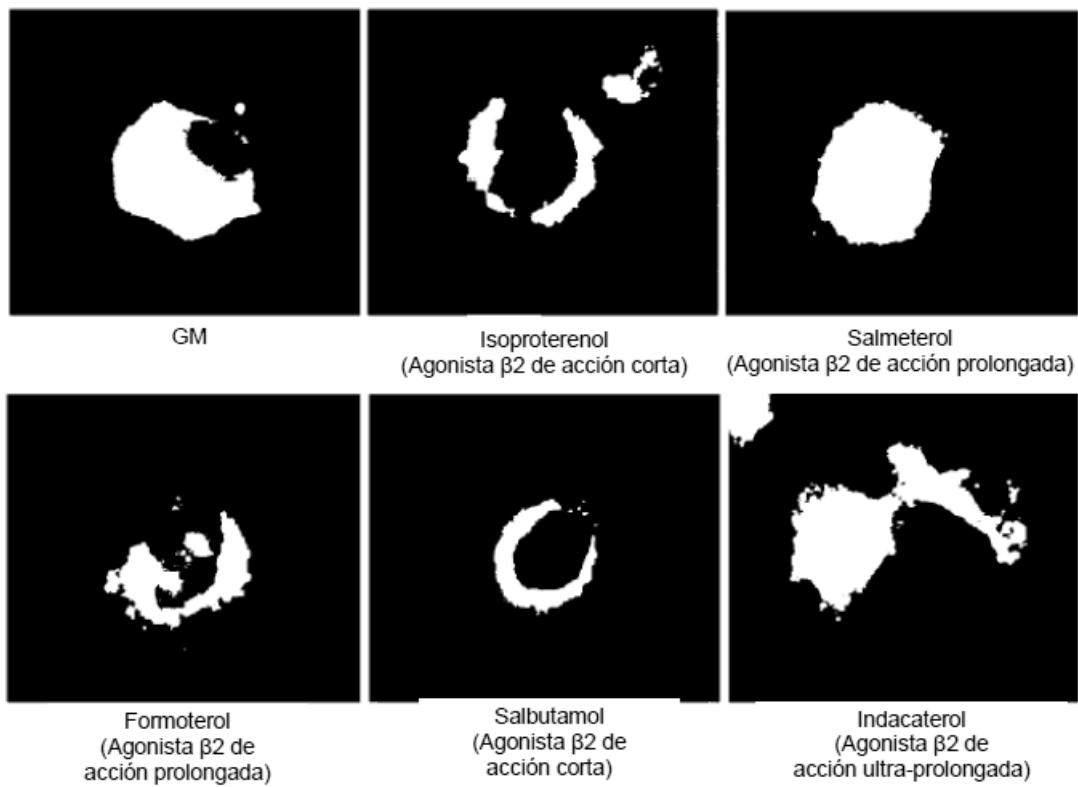
[Fig. 3]



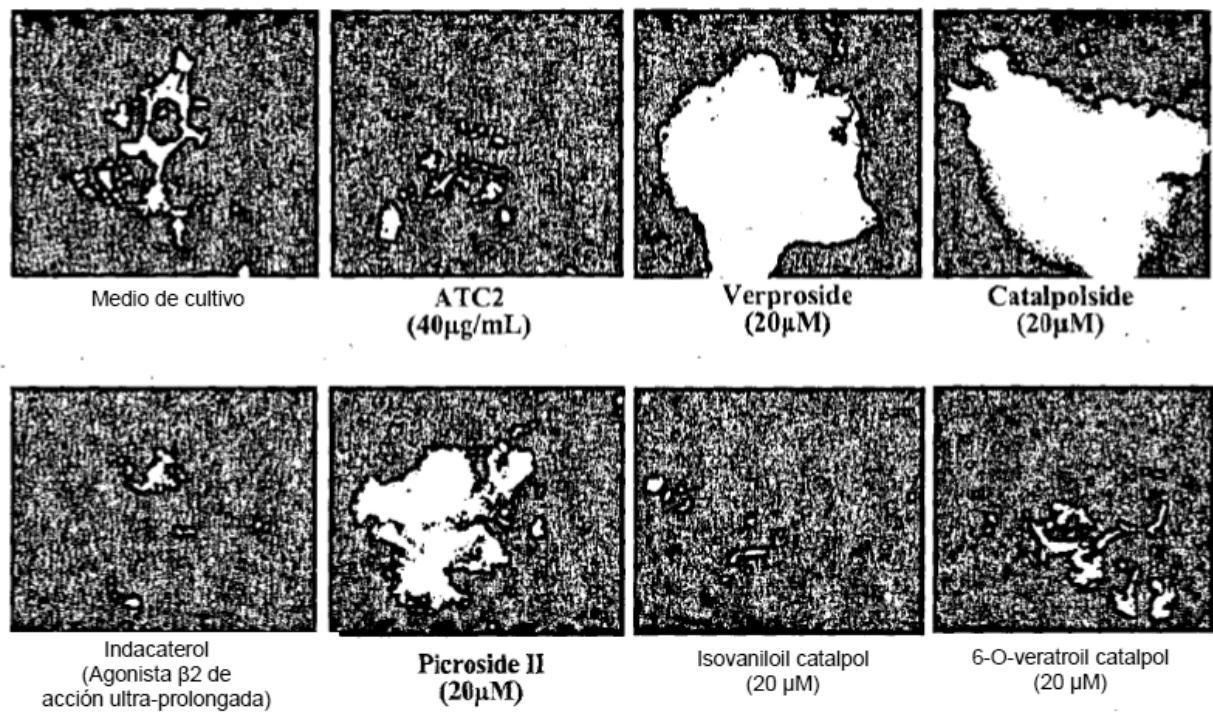
[Fig. 4]



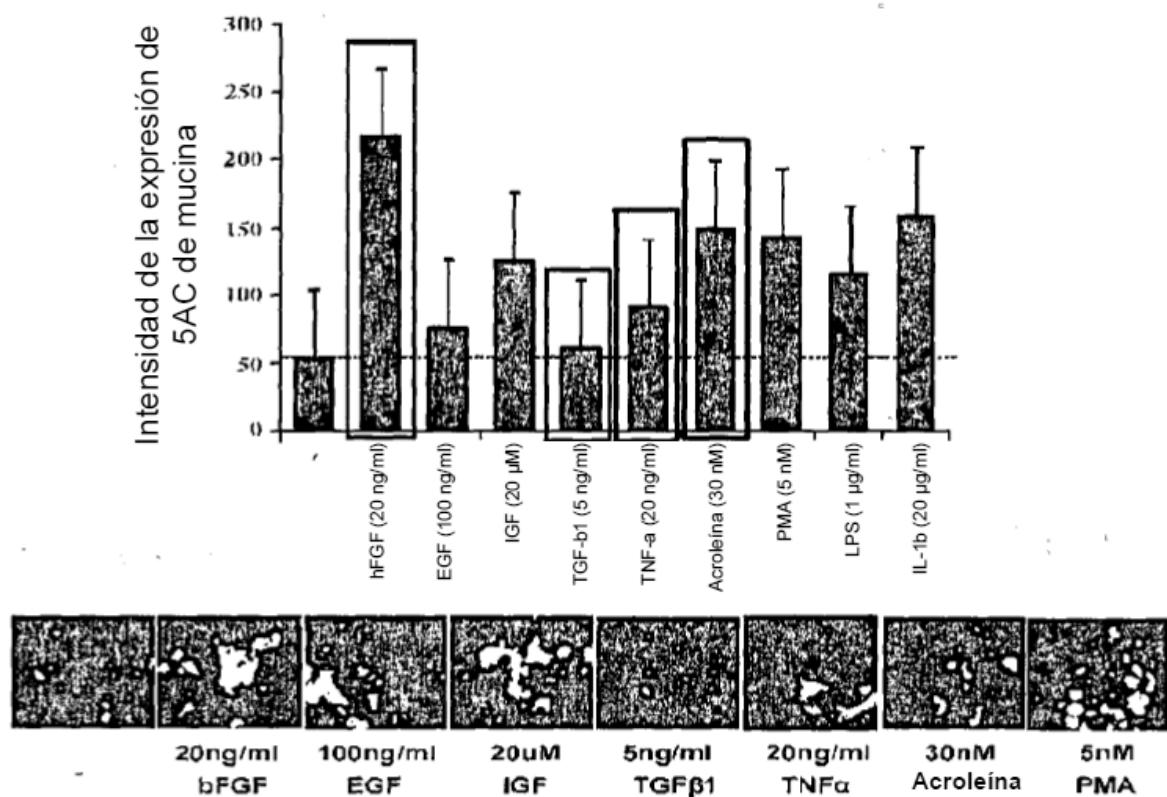
[Fig. 5]



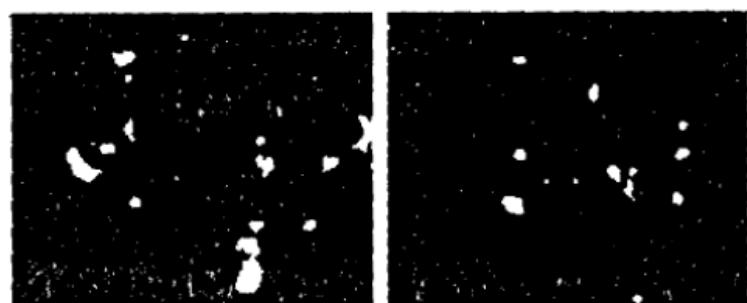
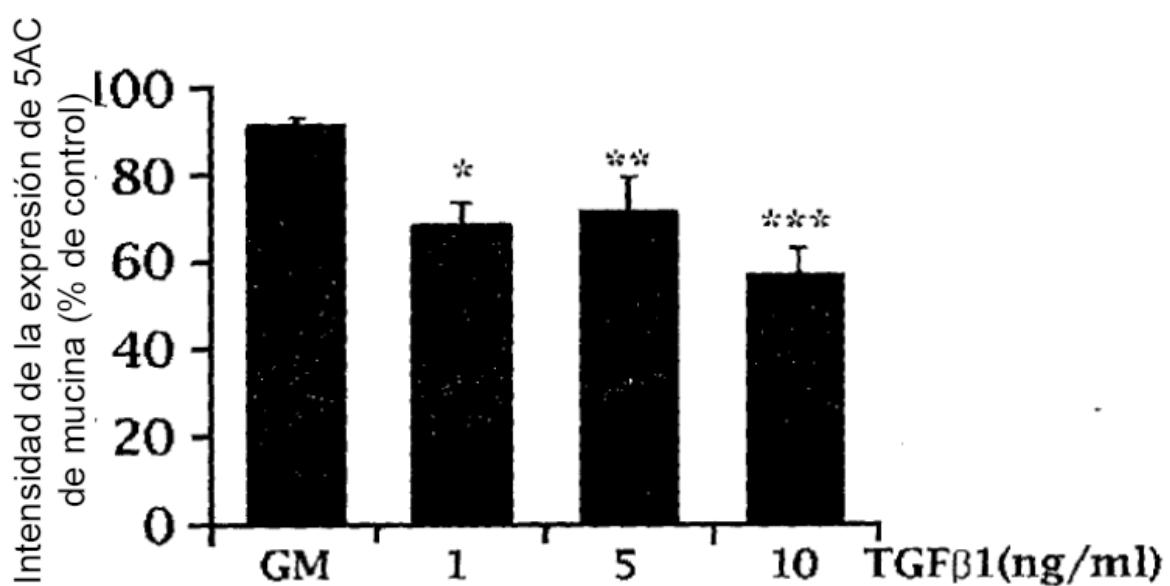
[Fig. 6]



[Fig. 7]

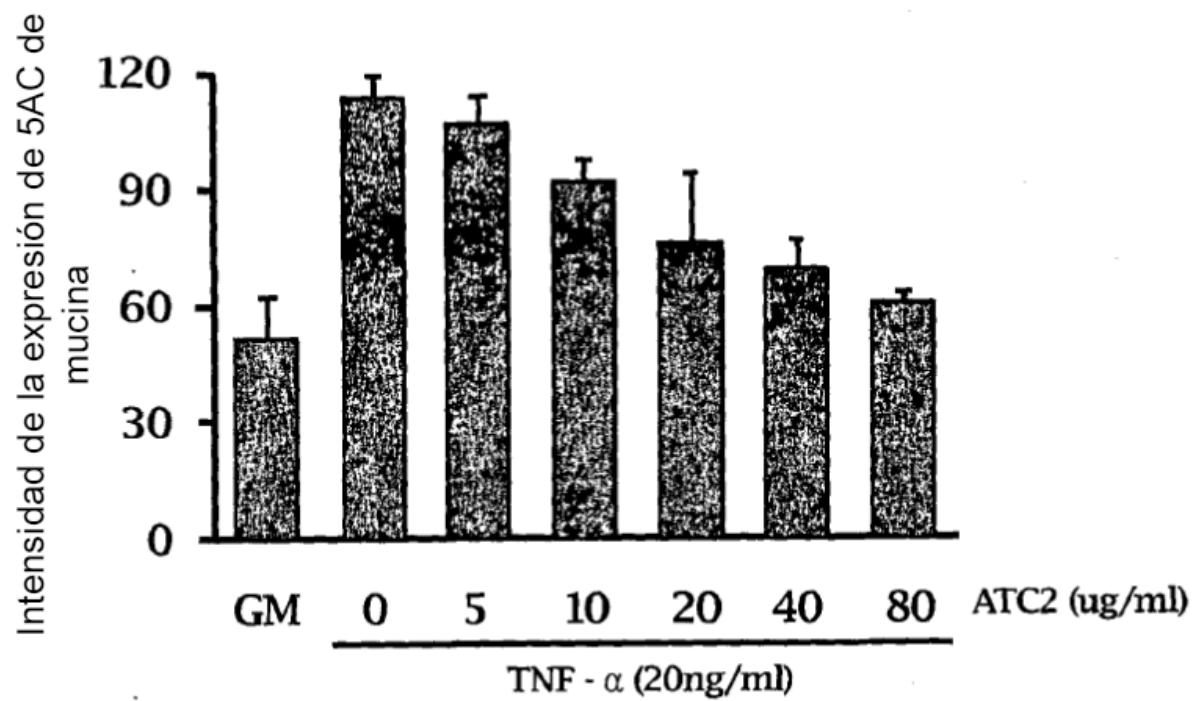


[Fig. 8]

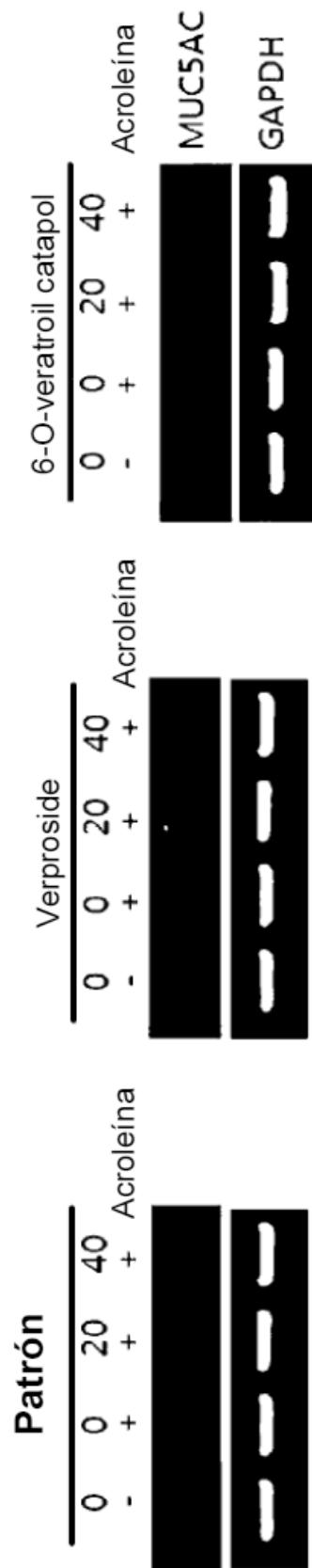


GM Sng/ml
TGF β 1

[Fig. 9]

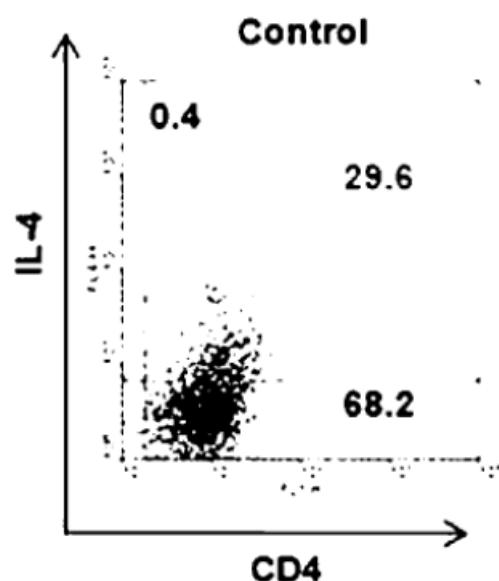


[Fig. 10]

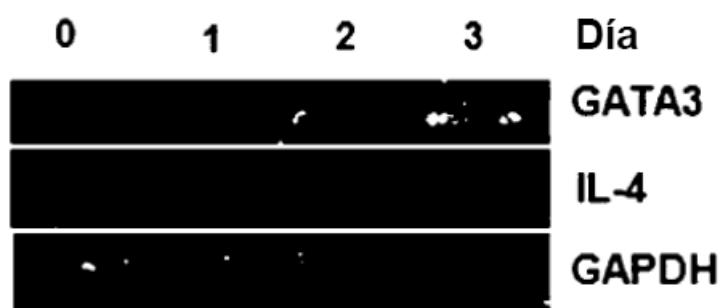


[Fig. 11]

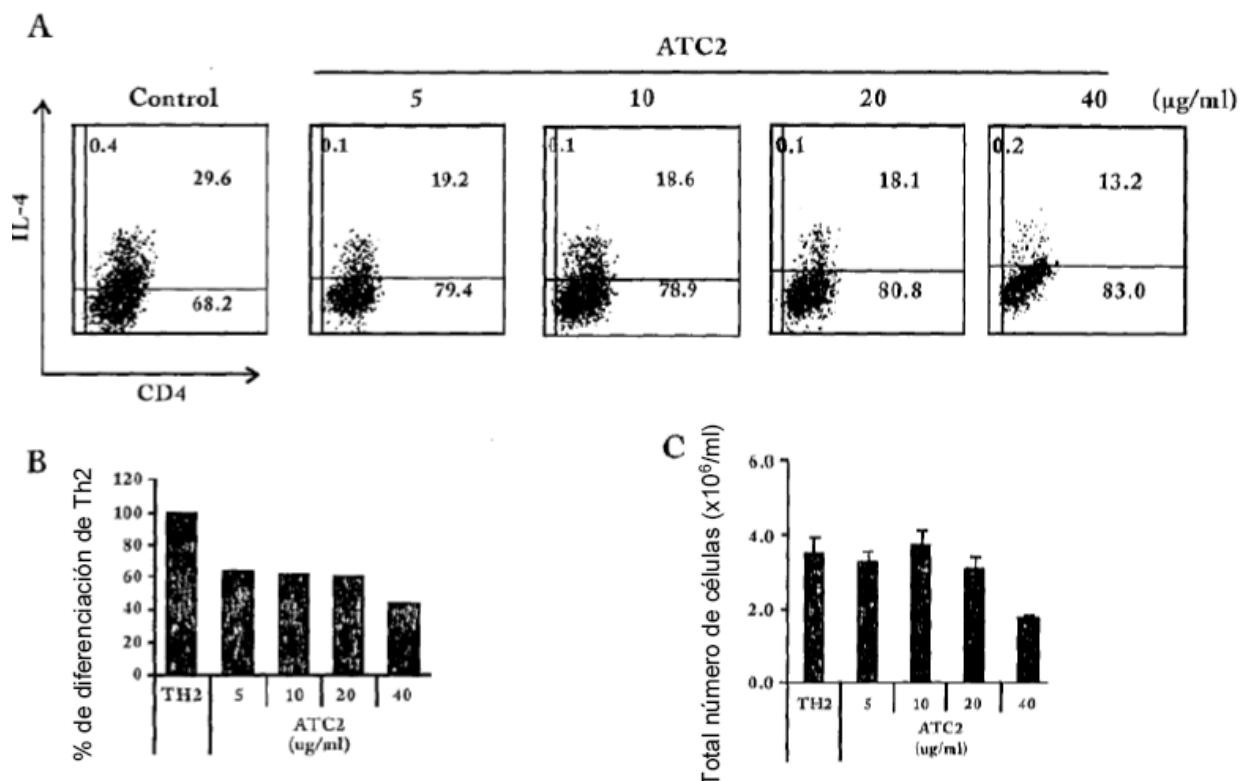
A



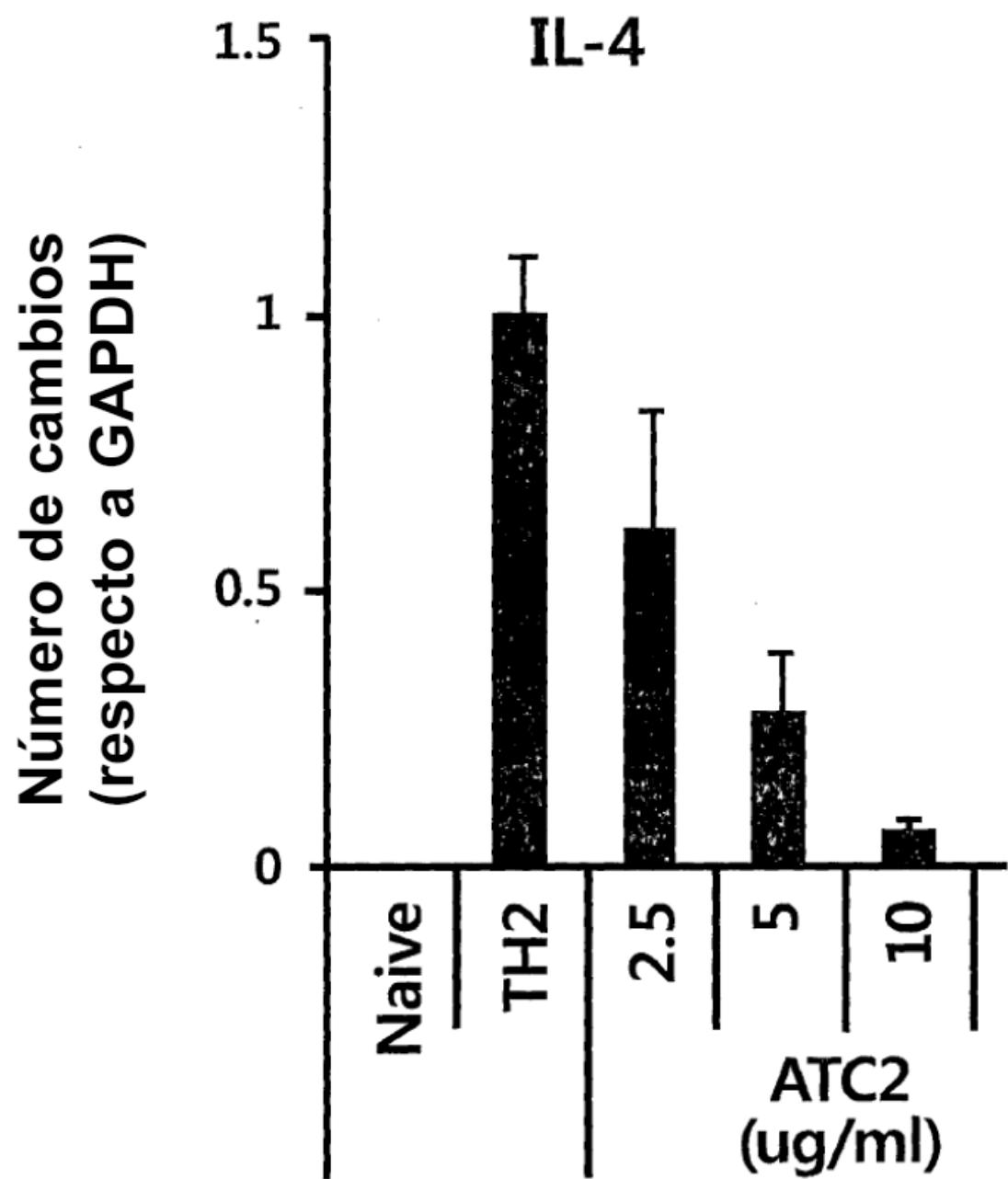
B



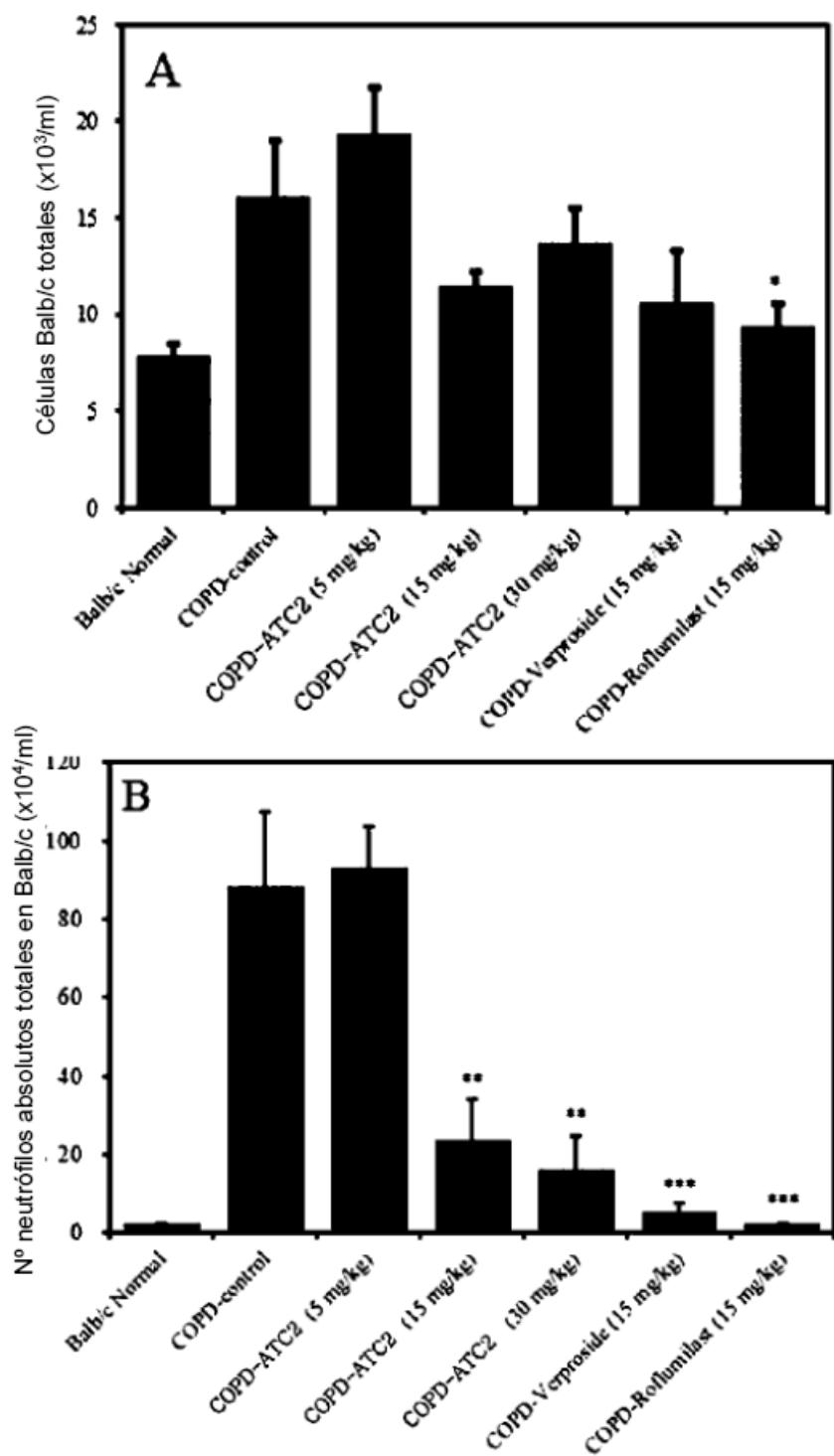
[Fig. 12]



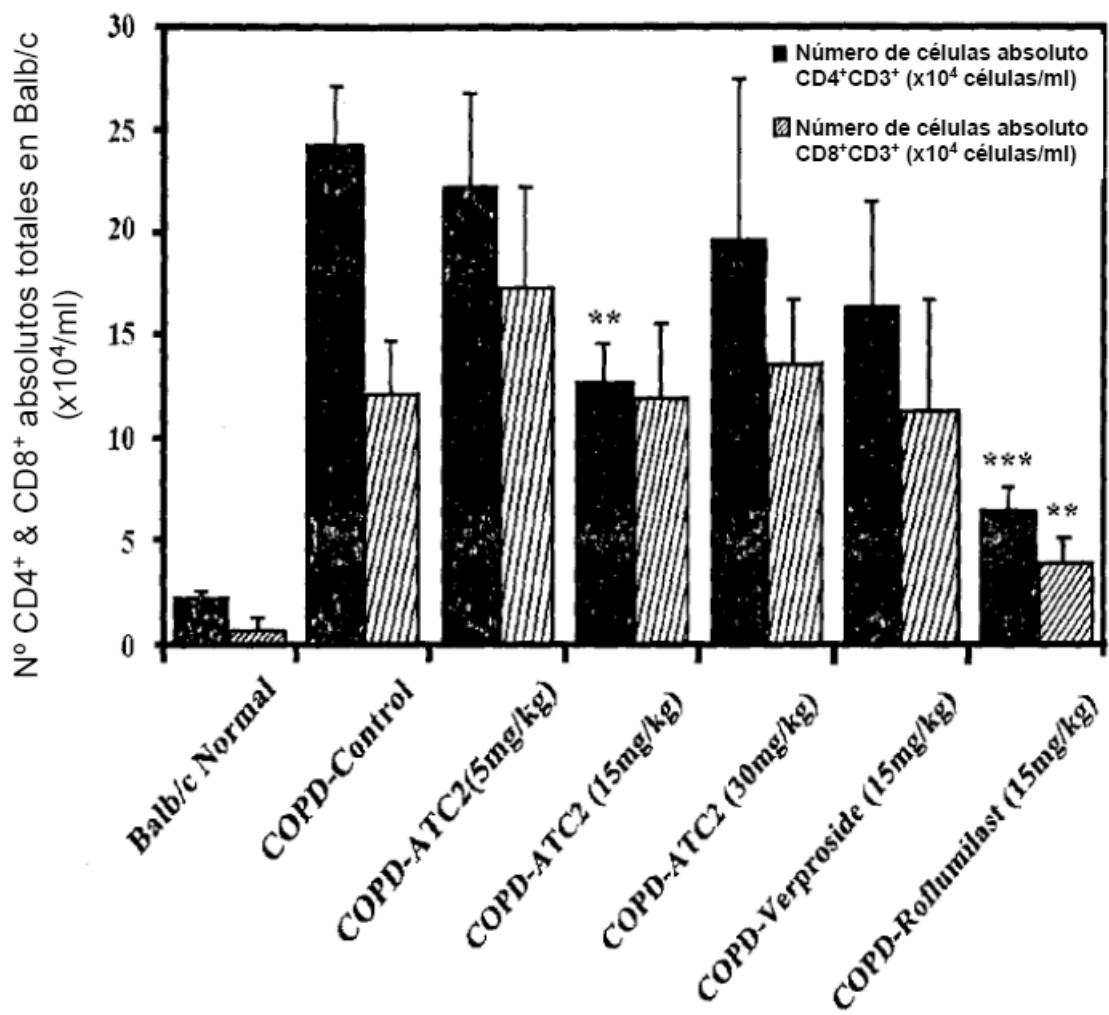
[Fig. 13]



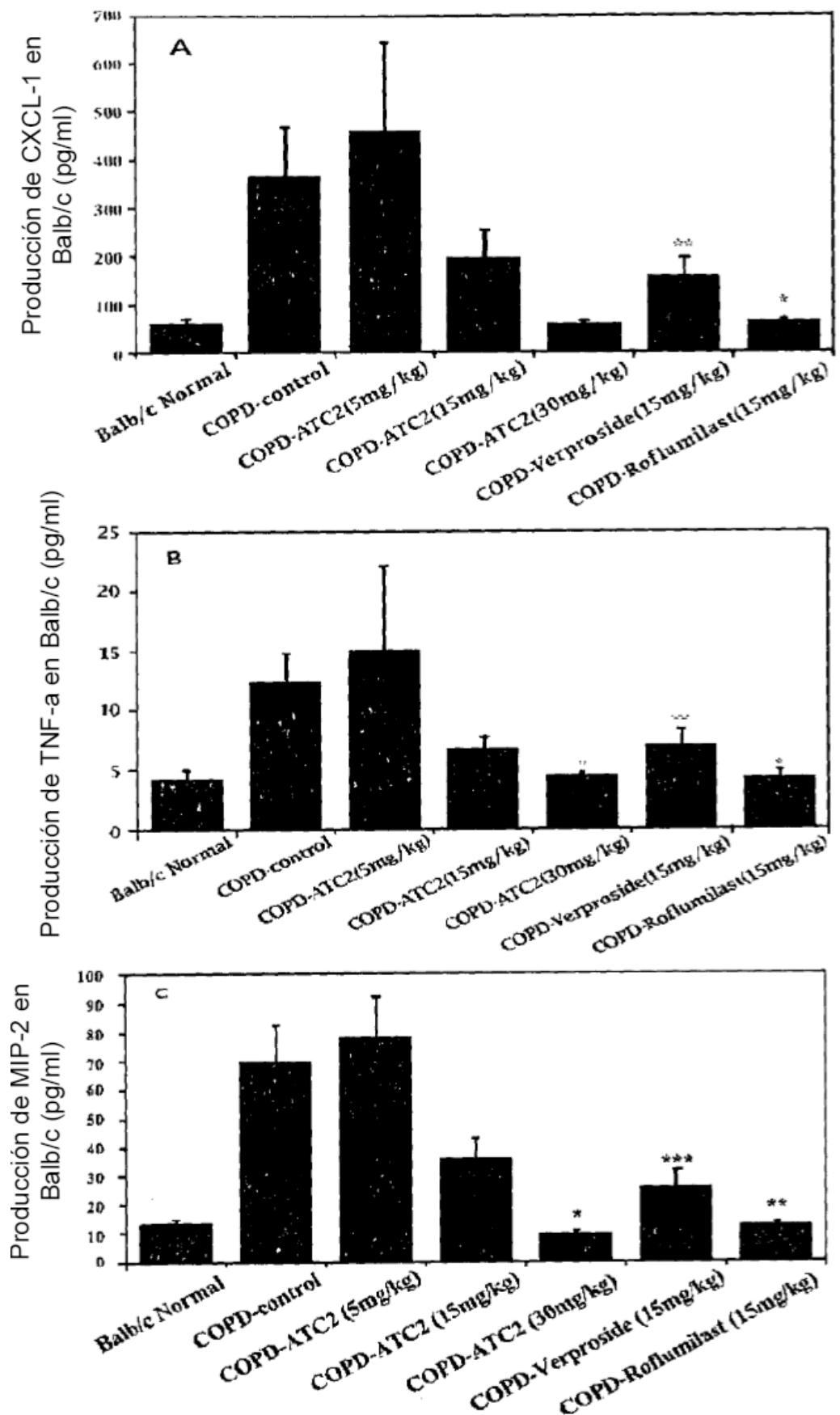
[Fig. 14]



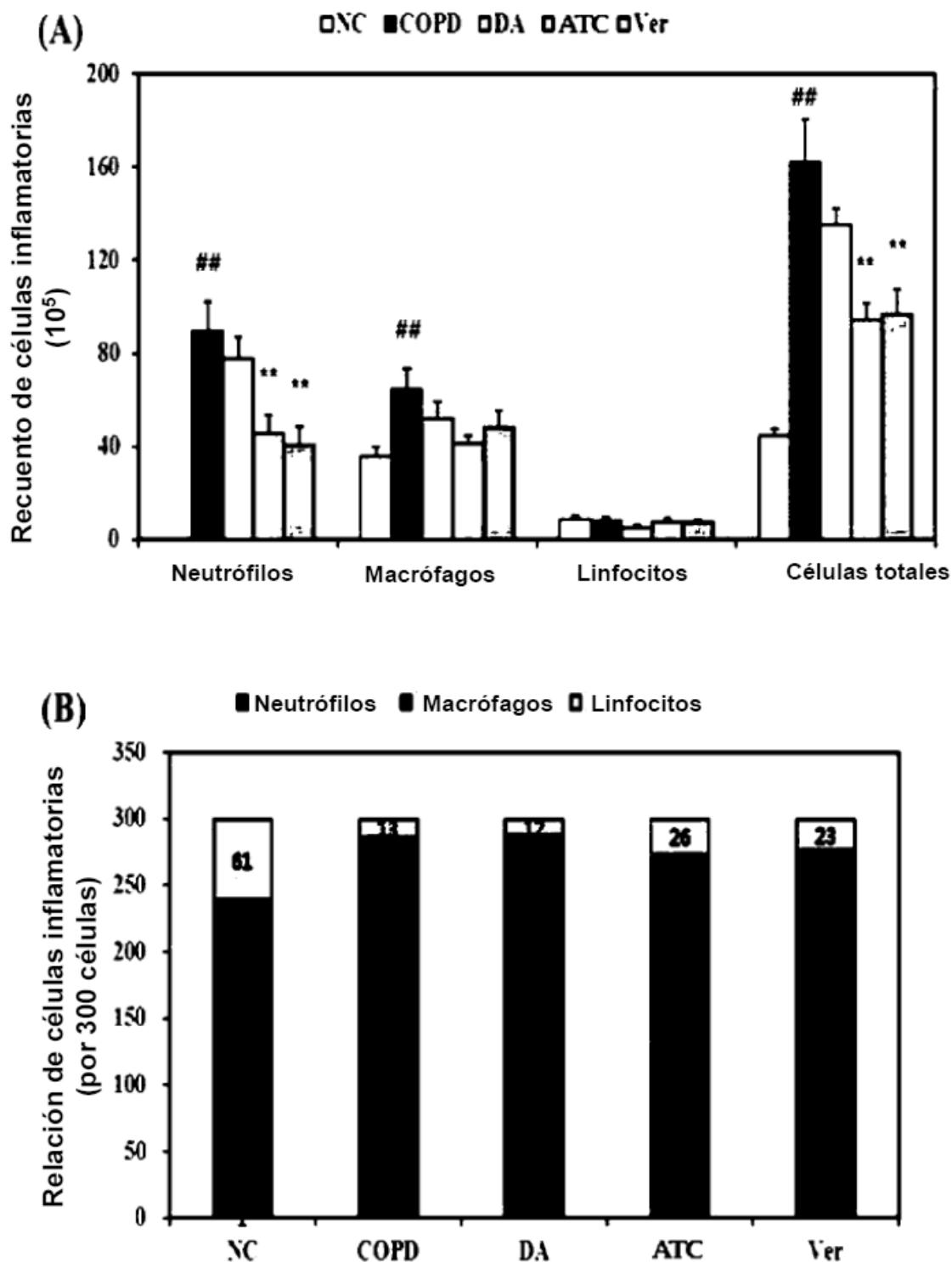
[Fig. 15]



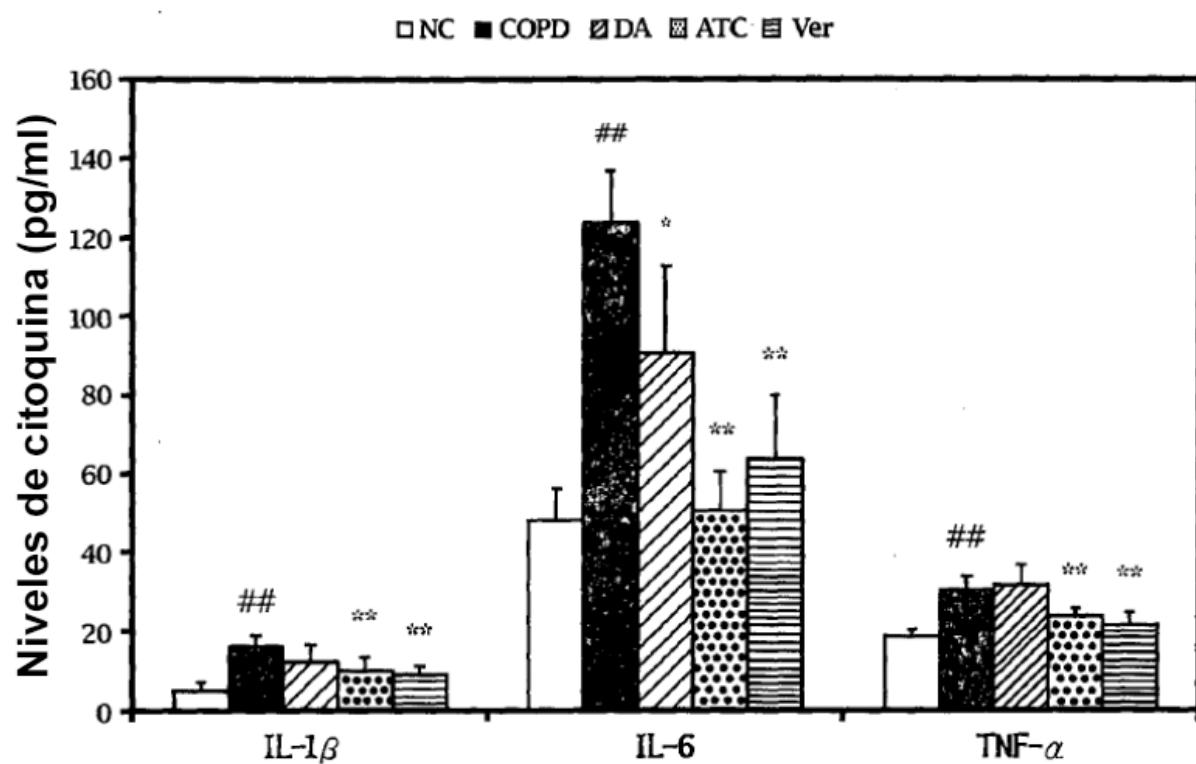
[Fig. 16]



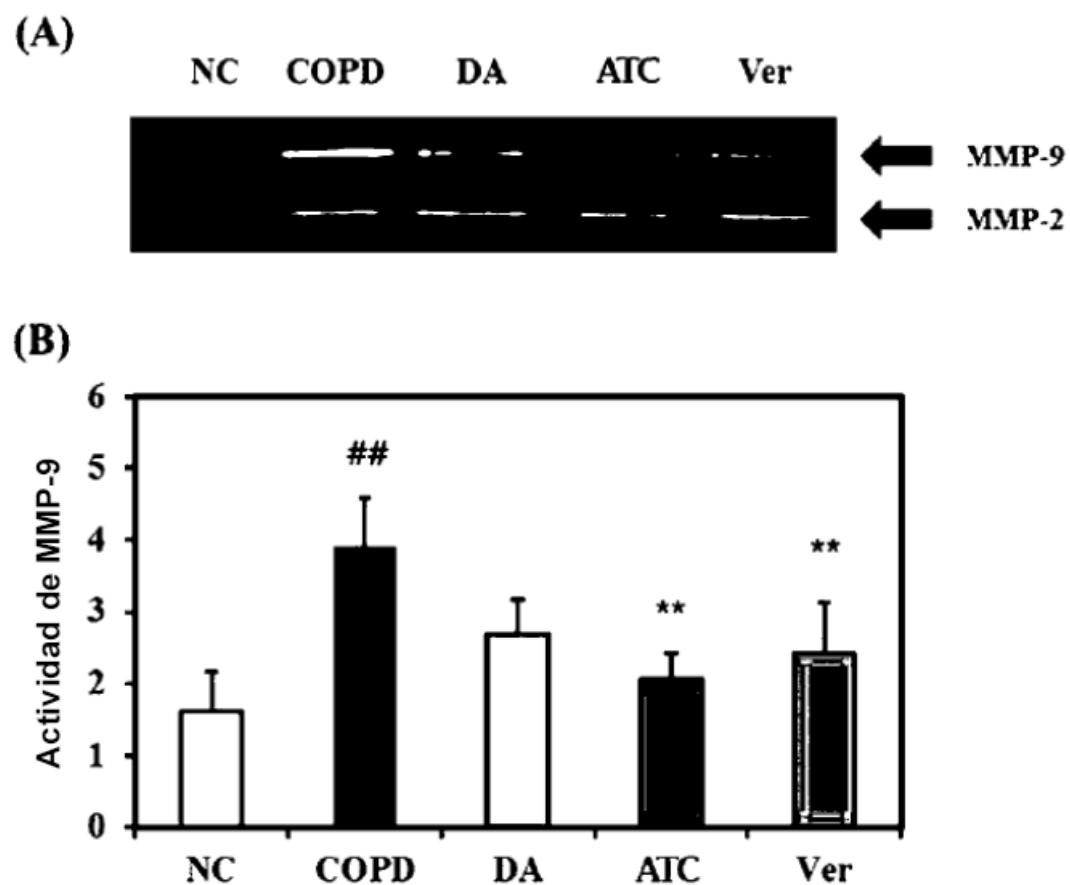
[Fig. 17]



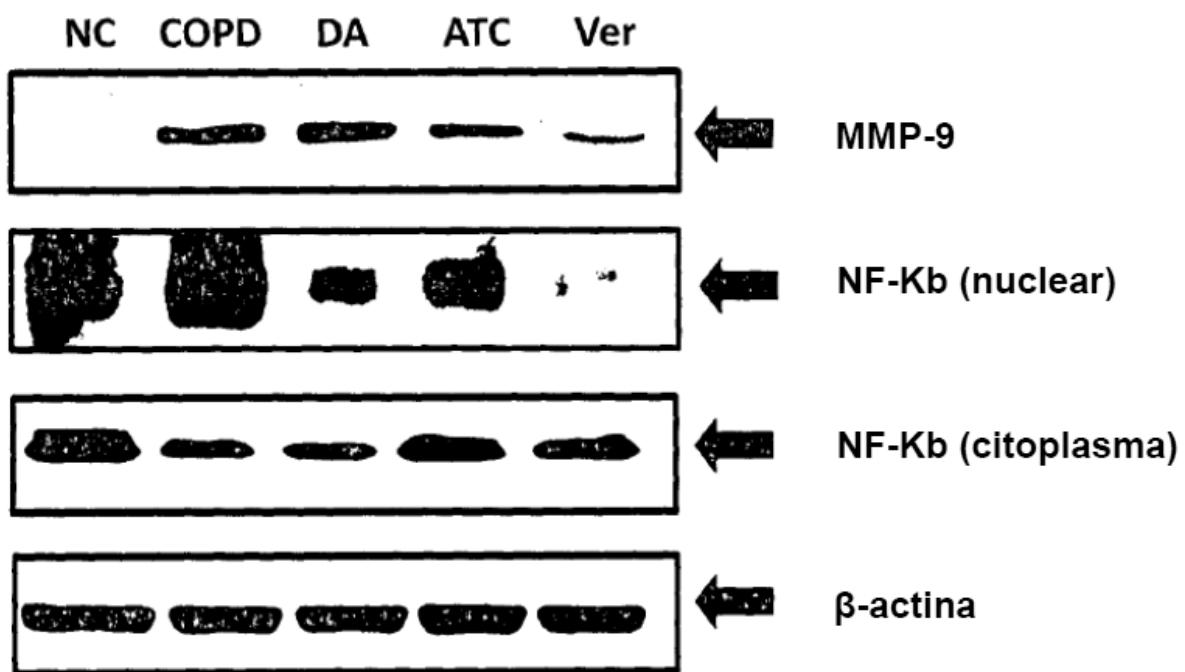
[Fig. 18]



[Fig. 19]



[Fig. 20]



[Fig. 21]

