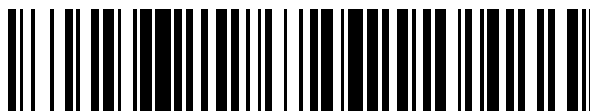


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 136**

51 Int. Cl.:

C07H 17/04 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 31/357 (2006.01)
A61K 36/80 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2015** **PCT/KR2015/007647**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016** **WO16013877**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2015** **E 15824692 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019** **EP 3172191**

54 Título: **Un novedoso compuesto aislado de Pseudolysimachion rotundum var. subintegrum que contiene abundante cantidad de principio activo, la composición que comprende el mismo para prevenir o tratar enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica y su uso**

30 Prioridad:

24.07.2014 KR 20140094023

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.12.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LEE, YONGNAM;
YOO, JI-SEOK;
SHIN, DAE-HEE;
RYOO, BYUNG-HWAN;
OH, SEI-RYANG;
AHN, KYUNG-SEOP;
LEE, HYEONG-KYU;
LEE, SU UI;
SONG, HYUK-HWAN;
SHIN, IN-SIK y
RYU, HYUNG WON

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 736 136 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

Un novedoso compuesto aislado de *Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum* que contiene abundante cantidad de principio activo, la composición que comprende el mismo para prevenir o tratar enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica y su uso

Campo técnico

La presente invención se refiere a un compuesto novedoso aislado de *Pseudolysimachion rotundum* var. *subintegrum*, la composición que comprende el mismo para prevenir o tratar enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica y su uso.

Técnica anterior

En general, una respuesta inflamatoria es una respuesta normal del organismo humano asociada a un edema, dolor, etc. en el caso de que un tejido o una célula reciban cualquier invasión que produzca algún cambio orgánico en el tejido o célula. Recientemente, se han descubierto varios tipos de citoquinas implicadas en las enfermedades inflamatorias.

La reacción alérgica se puede clasificar en cuatro categorías, es decir, tipo I, II, III y IV de acuerdo con los tipos de respuesta, o bien en dos categorías, es decir, reacción alérgica de tipo inmediato, tales como los tipos I, II o III, y la reacción alérgica de tipo retardado, tal como el tipo IV de acuerdo con los tipos de periodo desde el momento de la resensibilización producida por el alérgeno hasta el inicio de la reacción.

Entre ellos, la alergia de tipo I, en la que participa un anticuerpo de IgE y denominada como alergia de tipo anafilaxia, produce asma bronquial, enfermedades atópicas tales como dermatitis o gastroenteritis etc., rinitis alérgica tales como polinosis, conjuntivitis alérgica, alergia alimentaria, y similares.

Se considera que el asma es un síndrome complejo de las vías respiratorias que se caracteriza por varios síntomas clínicos, por ejemplo, tos, disnea causada por obstrucción del flujo de aire, inflamación de las vías respiratorias aguda o crónica, hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR) y remodelación estructural, y se puede recuperar de forma reversible o irreversible. La mayoría del asma es una enfermedad alérgica y se caracteriza por inflamación de las vías respiratorias crónica e hipersensibilidad bronquial (Minoguchi K y Adachi M., *Pathophysiology of asthma*. en: Chemiack NS, Altose MD, Homma I. editores. *Rehabilitation of the patient with respiratory disease*. Nueva York: McGraw-Hill, 1999, pp 97-104).

El asma se puede clasificar en dos tipos, es decir, asma extrínseca y asma intrínseca. El asma extrínseca se produce por la exposición a un antígeno, y se muestra como una reacción positiva en una prueba cutánea o estímulo bronquial contra el antígeno. Habitualmente, las edades de aparición son cada vez más tempranas. Está principalmente producida por los ácaros del polvo *Dermatophagoides* y el polen, epitelio de animales, hongos, y así sucesivamente. El asma intrínseca está producida por infecciones de las vías respiratorias superiores, ejercicio, inestabilidad emocional, cambio del clima de humedad y es habitual en pacientes adultos. Asimismo, el antígeno de IgE del asma extrínseca se puede detectar mediante una prueba cutánea debido a un aumento de la IgE sérica.

En lo que respecta a la fisiopatología, el asma se reconoce como una enfermedad inflamatoria activada por los linfocitos T auxiliares 2 (Th2), y una gran variedad de mediadores inflamatorios, tales como citoquinas, quimioquinas, moléculas de señalización, moléculas de adhesión y factores de crecimiento, de las células inmunitarias y de las células estructurales de las vías respiratorias están implicados en diferentes etapas del asma (Elias JA *et al.*, *J Clin Invest.* **2003**, 111, pp 291-297). Las células inflamatorias activadas tales como los eosinófilos, mastocitos, macrófagos alveolares etc. de los bronquios de pacientes que padecen asma, liberan varios mediadores inflamatorios tales como leucotrienos de cisteína, prostaglandinas etc. y están implicadas en una potente constricción bronquial (Maggi E. *et al.*, *Immunotechnology* **1998**, 3, 233-244.; Pawankar R. *et al.*, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2001**, 1, 3-6.; Barnes PJ *et al.*, *Pharmacol. Rev.* **1998**, 50, 515-596).

En consecuencia, como la reproducción de varias citoquinas implicadas en la activación de citoquinas inflamatorias, tales como IL-4, IL-5, IL-13 etc. e IgE y la reproducción de los leucotrienos de cisteína liberados de las células inflamatorias son las principales causas de inflamación, reacción alérgica y asma, estas se han estudiado mucho hasta ahora para desarrollar los agentes inhibidores de la reproducción de estas.

En general, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una enfermedad pulmonar producida por una enfermedad inflamatoria anómala del pulmón con resultado de obstrucción del tracto respiratorio. La EPOC produce disnea, resultado de impedir del flujo de aire de salida, y muestra características diferentes, por ejemplo, la poca reversibilidad de una limitación de las vías respiratorias o de la obstrucción de las vías respiratorias, el desarrollo progresivo a medida que pasa el tiempo etc., desde las características comunes del asma, y se puede clasificar como enfisema pulmonar o bronquitis obstructiva crónica (Barnes P.J., *Pharmacol.Rev.* 2004, **56**) 515-548).

Se ha notificado que la EPOC es uno factor de riesgo de la morbilidad y la mortalidad cardiovascular, y la quinta causa principal de mortalidad en todo el planeta en 2001. La prevalencia de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, según los criterios de la Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) (una relación de FEV1 a CVF de menos de 0,7) fue del 17,2 % (25,8 % en varones; 9,6 % en mujeres) entre los coreanos mayores de 45 años (Kim, D. S. *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2005**, 172, 842-847.; Sin, D.D. *et al.*, *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2005**, 2, 8-11.; Buist A.S. *et al.*, *Lancet*, 2007, 370, 741-750).

La mayoría de los pacientes con EPOC tienen los tres mecanismos patológicos (bronquitis obstructiva crónica, enfisema, y tapón mucoso) ya que todos están inducidos por el tabaquismo, pero pueden diferir en la proporción entre enfisema y bronquitis obstructiva. En los países desarrollados, el tabaquismo es con mucho la causa más común de EPOC, pero hay otros factores de riesgo adicionales, incluida la contaminación del aire (especialmente, la contaminación en espacios cerrados por quema de combustible), mala alimentación, y exposición laboral. La EPOC se caracteriza por una aceleración del declive normal de la función pulmonar que se observa con la edad. La lenta y progresiva limitación del flujo de aire lleva a incapacidad y muerte prematura y es bastante diferente de la obstrucción variable de las vías respiratorias y los síntomas del asma, que pocas veces aumenta de gravedad.

Se ha notificado que la acción patofisiológica y el síndrome de EPOC son fundamentalmente diferentes de los del asma. Aunque tanto la EPOC como el asma implican la inflamación del tracto respiratorio, existen notables diferencias en la naturaleza de los procesos inflamatorios, con diferencias en las células inflamatorias, mediadores, respuesta a la inflamación, distribución anatómica, y respuesta a la terapia con antiinflamatorios, por ejemplo, (a) con respecto a las células inflamatorias, mastocitos, eosinófilos, linfocitos CD4+ (Th2), macrófagos etc. actúan principalmente sobre la aparición de asma mientras que los neutrófilos, linfocitos CD8+ (Tc) etc. actúan principalmente sobre la aparición de EPOC; (b) con respecto a los mediadores inflamatorios, leucotrienos B, histamina, IL-4, IL-5, IL-13, eotaxina, RENTES, estrés oxidativo etc. están principalmente implicados en la aparición del asma mientras que TNF-alfa, IL-8, GRO-alfa etc. están principalmente implicados en la aparición de EPOC; (c) con respecto al síndrome inflamatorio, el asma muestra un síndrome inflamatorio diferente que actúa sobre la totalidad del tracto pulmonar a edad temprana, tales como AHR (hipersensibilidad de las vías respiratorias), diseminación epitelial, fibrosis, no implicación parenquimal, secreción de moco, obstrucción relativamente reversible de las vías respiratorias, tos, estornudos, disnea etc. de los de la EPOC, que se producen al actuar sobre las vías respiratorias periféricas en adultos y muestra varios fenómenos tales como, metaplasia epitelial, destrucción parenquimal, obstrucción relativamente irreversible de las vías respiratorias, bronquitis crónica, enfisema etc. (Barnes P.J., *Chest* **2000**, 117, 10S-14S.; Saetta M. *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2001**, 163, 1304-1309).

Los estudios histopatológicos sobre la EPOC muestran una implicación predominante de las vías respiratorias periféricas (bronquiolos) y del parénquima pulmonar, mientras que el asma implica la inflamación de todas las vías respiratorias pero sin afectación del parénquima pulmonar. Existe obstrucción de los bronquiolos, con fibrosis e infiltración de macrófagos y linfocitos T. Existe destrucción del parénquima pulmonar, así como un aumento en el número de macrófagos y linfocitos T CD8 (citotóxicos) (Saetta M. *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1998**, 157, 822-826). Las biopsias bronquiales muestran cambios similares con infiltración de macrófagos y linfocitos CD8 y un aumento en el número de neutrófilos en pacientes con EPOC grave (Di Stefano A. *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1998**, 158, 1277-1285).

A diferencia del asma, los eosinófilos no son relevantes salvo durante las reagudizaciones o cuando los pacientes tienen asma concomitante (Fabbri L. *et al.*, *Thorax* **1998**, 53, 803-808.; Fabbri LM. *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2003**, 167, 418-424).

En consecuencia, el enfoque terapéutico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) debe ser diferente del asma; sin embargo, la terapia actual se ha centrado en el tratamiento no específico de ambas enfermedades. Por lo tanto, no existen terapias con antiinflamatorios específicas de la EPOC, y las terapias con antiinflamatorios disponibles se desarrollaron inicialmente para el asma. Los desafíos a los que se enfrenta la investigación sobre EPOC tienen múltiples aspectos; los mecanismos subyacentes a la patología compleja y heterogénea de esta enfermedad requieren claridad; el papel de la inflamación en la progresión de la enfermedad debe confirmarse. (Hele D. *et al.*, *Expert. Opin. Invest. Drug*, **2003**, 12, 5-18.; Fox, J C. *et al.*, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2009**, 9, 231-242).

Las mejoras en la terapia actual disponible para tratar el asma en la forma de beta-agonistas de acción más prolongada, esteroides más seguros y terapias de combinación están en curso y, para la EPOC, los PD anticolinérgicos proporcionan alivio sintomático. Los esteroides se han utilizado para tratar las reagudizaciones, pero hasta el momento, ningún tratamiento ha mostrado alterar significativamente el progresivo declive de la función pulmonar en la EPOC o el desarrollo de asma.

En consecuencia, se ha estudiado mucho para desarrollar nuevos fármacos con potencial para tratar con éxito y de forma específica las enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o EPOC hasta ahora.

Los presentes inventores se han centrado en desarrollar un potente agente de tratamiento derivado de fuentes naturales de una forma segura y eficaz tales como plantas, animales etc. con potente actividad de tratamiento de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o EPOC y, finalmente, han descubierto

inesperadamente después resultados sorprendentes, por ejemplo, una potente actividad antiinflamatoria, antialérgica y antiasmática del extracto de of *Pseudolysimachion longifolium* (patente coreana n.º 10-860080 B1 y documento US 2012/0183632 A1) y varios compuestos aislados de la misma tales como, verprosida (6-O-3,4-dihidroxibenzoil catalpol), picrosida II (6-O-4-hidroxi-3-metoxioil catalpol), verminosida (6-O-3,4-Dihidroxi cinamoil catalpol), 6-O-veratroil catalpol (6-O-3,4-Dimetoxibenzoil catalpol), minecosida (6-O-3-hidroxi-4-metoxicinnamoil catalpol), catalpol y similares (publicación de patente coreana n.º 10-2006-125499 A1; documento WO 2006/129964 A1; WO 2014/104672 A1); una potente actividad antiinflamatoria, antialérgica y antiasmática del novedoso extracto purificado que contiene gran cantidad de principios activos tales como derivados de catalpol del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum (ATC2: patente coreana n.º 1476045 B1, ATC1: patente coreana n.º 1504651 B1); y actividad anti-EPOC de dichos extractos (patente coreana n.º 1476095 B1) hasta ahora.

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

Basándose en los estudios anteriores sobre la actividad antiinflamatoria, antialérgica y antiasmática del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum, los presentes inventores han intentado desarrollar un novedoso compuesto que muestre actividad antiinflamatoria, antialérgica, antiasmática y anti-EPOC aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum.

Sin embargo, no se había notificado ni divulgado ningún compuesto novedoso que mostrara actividad antiinflamatoria, antialérgica, antiasmática y anti-EPOC aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum en la bibliografía anteriormente citada, cuya memoria descriptiva se ha incorporado por referencia en el presente documento.

En consecuencia, los presentes inventores han descubierto un compuesto novedoso que muestra actividad antiinflamatoria, antialérgica, antiasmática y anti-EPOC aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum y el compuesto de la invención ha mostrado una potente actividad antiinflamatoria, antialérgica, antiasmática y anti-EPOC en diferentes ensayos *in vitro*, por ejemplo, (1) ensayo citotóxico usando la línea de células HT1080, H292 y EL4, (2) un ensayo de inhibición de la expresión de MUC5AC (formación de moco oligomérico/gel) inducido por TNF-alfa, (3) ensayo indicador con luciferasa de NF-kappa B, (4) ensayo de inhibición sobre la actividad del factor de transcripción de NF-kappa B; (5) inhibición de la expresión del ARNm de genes diana tales como MMP-9, MUC5AC e IL-4 mediante la inhibición de la actividad de NF-kappa B; (6) efecto de inhibición dependiente de la dosis sobre la reproducción de MUC5AC en un ensayo de reproducción de la proteína MUC5AC; así como ensayos *in vivo*, por ejemplo, (7) efecto de reducir el número de células inflamatorias tales como eosinófilos usando un modelo de ratón sensibilizado/estimulado con OVA, (8) ensayo de inhibición sobre la liberación de IgE, citoquinas inflamatorias tales como IL-4, IL-5, IL-13 etc. en fluido BALF e infiltración de células inflamadas, así como la supresión de la hipersensibilidad de las vías respiratorias e hiperplasia de las células de globo, (9) un ensayo de inhibición que utiliza un modelo animal de EPOC (ratón C57B/6N) sobre la proliferación de células inflamatorias en fluido BALF, la inhibición de la reproducción de ROS (especies reactivas de oxígeno), y la actividad de la elastasa de neutrófilos, el efecto de reducción del nivel de IL-6, TNF-alfa y las células inflamatorias infiltradas, etc.

Divulgación de la invención

Problema técnico

La presente invención proporciona un compuesto novedoso (KS534) aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum.

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica y un alimento saludable que comprende el compuesto novedoso (KS534) aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum como principio activo en una cantidad eficaz para su uso en el tratamiento y prevención de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad de EPOC.

La presente invención proporciona también un uso del compuesto novedoso (KS534) aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum como principio activo en una cantidad eficaz para su uso en el tratamiento y prevención de enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, asma o EPOC.

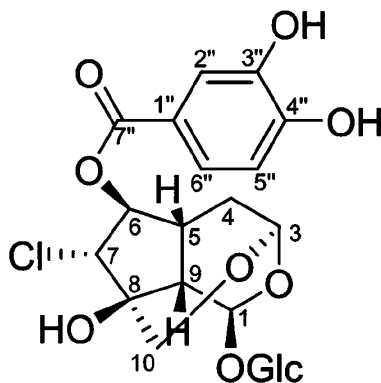
La presente invención proporciona también el compuesto novedoso (KS534) para su uso en un método para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, asma o EPOC en un mamífero o ser humano que comprende administrar a dicho mamífero o ser humano una cantidad eficaz del compuesto novedoso (KS534) aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum, junto con un transportador farmacéuticamente aceptable del mismo.

Solución del problema

La presente invención proporciona 3,4-dihidroxi benzoato de (3R,5S,5aS,6R,7S,8R,8aS)-8-cloro-8a-hidroxi-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-

5 metanociclopenta[e][1,3]dioxepin-7-il (KS534) representado por la siguiente fórmula química (1), la sal farmacéuticamente aceptable del mismo o solvatos del mismo:

[Fórmula química 1]



(1)

El novedoso compuesto de la invención se puede transformar en su sal y solvatos farmacéuticamente aceptables, por los métodos convencionales bien conocidos en la técnica. Para las sales, la sal de adición de ácido del mismo formado a partir de un ácido libre farmacéuticamente aceptable del mismo es útil y se puede preparar por el método convencional. Por ejemplo, tras disolver el compuesto en la cantidad en exceso de solución ácida, las sales se precipitan con el disolvente orgánico miscible con el agua tal como metanol, etanol, acetona o acetonitrilo para preparar la sal de adición de ácido del mismo y adicionalmente la mezcla de una cantidad equivalente de compuesto y ácido diluido con agua o alcohol tal como glicol monometiléter, se puede calentar y posteriormente secar por evaporación o filtrarse a presión reducida para obtener la forma salina seca del mismo.

Como ácido libre del método anteriormente descrito, se puede usar ácido orgánico o ácido orgánico. Por ejemplo, un ácido orgánico tal como ácido metanosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido cítrico, ácido maleico, ácido succínico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido glicólico, ácido glucónico, ácido galacturónico, ácido glutámico, ácido glutárico, ácido glucurónico, ácido aspártico, ácido ascórbico, ácido carbonílico, ácido vanílico, ácido yodhídrico y similares, y ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido tartárico y similares, son de utilidad en el presente documento.

Además, la forma de sal metálica farmacéuticamente aceptable de los compuestos de la invención se puede preparar usando una base. La sal de metal alcalino o de metal alcalinotérreo del mismo se pueden prepararse por el método convencional, por ejemplo, tras disolución del compuesto en una cantidad en exceso de solución de hidróxido de metal alcalino o de hidróxido de metal alcalinotérreo, las sales insolubles se filtran y el filtrado remanente se somete a evaporación y secado para obtener la sal metálica del mismo. Como sal metálica de la presente invención, las sales de sodio, potasio o calcio son farmacéuticamente adecuadas, y la correspondiente sal de plata se pueden preparar haciendo reaccionar una sal de metal alcalino o sal de metal alcalinotérreo con una sal de plata adecuada tal como nitrato de plata.

La sal farmacéuticamente aceptable del compuesto comprende todas las sales ácidas o básicas que pueden estar presentes en los compuestos, si no se indica específicamente en el presente documento. Por ejemplo, la sal farmacéuticamente aceptable de la presente invención comprende la sal del grupo hidroxilo tal como las sales de sodio, potasio o calcio del mismo; la sal del grupo amido tal como la sal de bromhidrato, sal de ácido sulfúrico, sal de ácido hidrogenosulfúrico, sal de fosfato, sal de hidrogenofosfato, sal de dihidrofosfato, sal de acetato, sal de succinato, sal de citrato, sal de tartrato, sal de lactato, sal de mandelato, sal de metanosulfonato (mesilato) y sal de *p*-toluenosulfonato (tosilato) etc., que se pueden preparar por el método convencional bien conocido en la técnica.

Pueden existir en forma de diastereoisómeros ópticamente diferentes ya que los compuestos divulgados tienen centros asimétricos, por consiguiente, los compuestos de la presente divulgación comprenden todos los isómeros ópticamente activos, estereoisómeros R o S y mezclas de los mismos. La solicitud divulga además todos los usos de la mezcla racémica, más de un isómero ópticamente activo o las mezclas de los mismos así como el método de preparación o aislamiento del diastereoisómero bien conocido en la técnica.

Los compuestos de la invención se pueden aislar a partir del método de aislamiento o purificación que es bien conocido en la técnica tal como la cromatografía en columna de gel de sílice o el método de recristalización, por ejemplo, el método divulgado en la publicación de patente coreana n.º 10-2006-125499; o sintetizarse químicamente por métodos bien conocidos en la técnica, que son meramente ilustrativos y de ninguna forma limitan la invención.

El novedoso compuesto de la invención (KS 534) se puede preparar a partir de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* mediante el siguiente procedimiento:

Por ejemplo, el novedoso compuesto (KS 534) se caracteriza por preparar mediante el proceso de; añadir al menos un disolvente de extracción seleccionado entre agua, alcohol inferior C1-C4 tales como metanol, etanol, butanol etc. o mezclas de los mismos, preferentemente, mezcla de agua y metanol, más preferentemente, 10 - 100 % (p/p) de metanol en agua a *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* seca en la 1ª etapa; someterse a al menos un método de extracción seleccionado entre extracción a temperatura de reflujo con agua caliente, extracción con agua fría, ultrasonificación o extracción convencionales, preferentemente extracción con agua fría a una temperatura comprendida de 10 a 150 °C, preferentemente de 20 a 70 °C, para el período comprendido de 30 min a 72 horas, preferentemente, de 1 a 48 horas, más preferentemente, extracción con agua fría a una temperatura comprendida de 10 a 60 °C, preferentemente de 20 a 50 °C, para el período comprendido de 30 min a 72 horas, preferentemente, 6 a 48 horas repetidas veces y, a continuación, extracción con reflujo a una temperatura comprendida de 40 a 120 °C, preferentemente de 60 a 90 °C, para el período comprendido de 30 min a 72 horas, preferentemente, de 6 a 48 horas, repetidas veces, para conseguir el 1^{er} extracto de la 2ª etapa; someter a filtración, concentración al vacío y método de secado para conseguir el extracto en bruto de la 3ª etapa; y someter a al menos un proceso de purificación seleccionado entre (i) cromatografía de reparto en fase invertida, (ii) cromatografía en columna ultrarrápida, (iii) cromatografía en columna RP C18, (iv) cromatografía en columna de gel de sílice, (v) cromatografía de intercambio iónico o (vi) cromatografía de exclusión molecular repetidamente para conseguir el compuesto novedoso (KS 534) de la presente invención.

La expresión "transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables" definida en el presente documento comprende aditivos farmacéuticos, los principios inactivos usados para fabricar medicación. Incluyen colorantes, aromas, aglutinantes, emolientes, cargas, lubricantes, conservantes, y otras muchas clasificaciones. Los excipientes habituales incluyen almidón de maíz, lactosa, talco, estearato de magnesio, sacarosa, gelatina, estearato de calcio, dióxido de silicio, shellac y vidriado, que son bien conocidos en la materia (véase, la página principal de la Food and Drug Administration: www.fda.gov o la información farmacológica en línea: www.drugs.com) o la bibliografía anterior (por ejemplo, Rowe, Raymond C *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press, 7ª Edición, 2012)

El término "prevenir" divulgado en el presente documento comprende cualquier acto para inhibir o retrasar el inicio de alguna enfermedad o trastorno divulgado en el presente documento, mediante la administración de la composición de la invención; y el término "tratar" divulgado en el presente documento comprende cualquier acto para aliviar o cambiar favorablemente el síntoma asociado con cierta enfermedad o trastorno divulgado en el presente documento, mediante la administración de la composición de la invención.

Los presentes inventores han descubierto que el novedoso compuesto (KS 534) que se puede preparar a partir de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* mostró una potente actividad antiinflamatoria, antialérgica, antiasmática y anti-EPOC en diferentes ensayos *in vitro*, por ejemplo, (1) ensayo citotóxico usando la línea de células HT1080, H292 y EL4, (2) un ensayo de inhibición de la expresión de MUC5AC (formación de moco oligomérico/gel) inducido por TNF-alfa, (3) ensayo indicador con luciferasa de NF-kappa B, (4) ensayo de inhibición sobre la actividad del factor de transcripción de NF-kappa B; (5) inhibición de la expresión del ARNm de genes diana tales como MMP-9, MUC5AC e IL-4 mediante la inhibición de la actividad de NF-kappa B; (6) efecto de inhibición dependiente de la dosis sobre la reproducción de MUC5AC en un ensayo de reproducción de la proteína MUC5AC; así como ensayos *in vivo*, por ejemplo, (7) efecto de reducir el número de células inflamatorias tales como eosinófilos usando un modelo de ratón sensibilizado/estimulado con OVA, (8) ensayo de inhibición sobre la liberación de IgE, citoquinas inflamatorias tales como IL-4, IL-5, IL-13 etc. en fluido BALF e infiltración de células inflamadas, así como la supresión de la hipersensibilidad de las vías respiratorias e hiperplasia de las células de globo, (9) un ensayo de inhibición que utiliza un modelo animal de EPOC (ratón C57B/6N) sobre la proliferación de células inflamatorias en fluido BALF, la inhibición de la reproducción de ROS (especies reactivas de oxígeno), y la actividad de la elastasa de neutrófilos, el efecto de reducción del nivel de IL-6, TNF-alfa y las células inflamatorias infiltradas, etc.

En consecuencia, de acuerdo con el otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona una composición farmacéutica o un alimento funcional saludable que comprende el compuesto novedoso (KS534) aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* como principio activo en una cantidad eficaz para tratar y prevenir enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad de EPOC.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica o un alimento funcional saludable que comprende el compuesto novedoso (KS534) aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* y los transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento o prevención de enfermedades

alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona también un uso del compuesto novedoso (KS534) aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum como principio activo en una cantidad eficaz para su uso en el tratamiento y prevención de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona también un uso del compuesto novedoso (KS534) aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum y los transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables para la fabricación de medicinas utilizadas para tratar o prevenir enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, también se proporciona un método para tratar o prevenir enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en mamíferos, donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto novedoso (KS534) aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum al mamífero que padece enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, también se proporciona un método para tratar o prevenir enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en mamíferos, donde el método comprende administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto novedoso (KS534) aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum y los transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, al mamífero que padece enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

La composición de la invención para tratar y prevenir enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) puede comprender los compuestos anteriores en un 0,1 ~ 99 %, preferentemente, 0,1 ~ 50 % en peso basado en el peso total de la composición.

La composición de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar en forma de una composición farmacéutica que contiene transportadores, adyuvantes o diluyentes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidones, caucho de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente cargas, agentes antiaglutinantes, agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes aromatizantes, emulsionantes, conservantes y similares. Las composiciones de la invención pueden formularse de manera que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de su administración a un paciente empleando cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la materia.

Por ejemplo, las composiciones de la presente invención se pueden disolver en aceites, propilenglicol u otros disolventes que se utilizan habitualmente para producir una inyección. Los portadores adecuados de transportadores incluyen solución salina fisiológica, polietilenglicol, etanol, aceites vegetales, miristato de isopropilo, etc., aunque no están limitados a los mismos. Para la administración tópica, el extracto de la presente invención se puede formular como pomadas y cremas.

Las formulaciones farmacéuticas que contienen la presente composición se pueden preparar en cualquier forma, tal como una forma farmacéutica oral (polvo, comprimido, cápsula, cápsula blanda, medicina acuosa, jarabe, elixires, píldoras, polvo, sobrecillo, gránulo), o preparación tópica (crema, pomada, loción, gel, bálsamo, parche, pasta, solución de pulverización, aerosol y similares) o una preparación inyectable (solución, suspensión, emulsión).

La composición de la presente invención en formas de dosificación farmacéutica se puede usar como sus sales farmacéuticamente aceptables, y también se pueden usar solas o en una asociación adecuada, así como junto con otros compuestos farmacéuticamente activos.

La dosis deseable del compuesto de la invención varía dependiendo de la dolencia y el peso del sujeto, gravedad, forma del fármaco, vía y periodo de administración, y un experto en la materia puede seleccionarla. Sin embargo, para obtener efectos deseables, se recomienda por lo general administrar en una cantidad comprendida de 0,0001 a 1000 mg/kg, preferentemente, de 0,001 a 100 mg/kg por peso/día del extracto inventivo de la presente invención. La dosis se puede administrar de una vez o dividirse en varias veces al día.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar a un sujeto animal tal como un mamífero (rata, ratón, animales domésticos o seres humanos) por varias vías. Se contemplan todos los modos de administración, por ejemplo, la administración puede realizarse por vía oral, por vía rectal o mediante inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracutánea, intratecal, epidural o intracerebroventricular.

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica y un alimento saludable que comprende

el compuesto novedoso (KS534) aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum como principio activo en una cantidad eficaz para tratar y prevenir enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad de EPOC.

- 5 La presente invención proporciona también un uso del compuesto novedoso (KS534) aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum como principio activo en una cantidad eficaz para su uso en el tratamiento y prevención de enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, asma o EPOC.

- 10 La presente invención proporciona también un método para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, asma o EPOC en un mamífero o ser humano que comprende administrar a dicho mamífero o ser humano una cantidad eficaz del compuesto novedoso (KS534) aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum, junto con un transportador farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 15 El extracto inventivo de la presente invención también se puede usar como componente principal o aditivo y agente auxiliar en la preparación de diversos alimentos funcionales saludables y alimentos para el cuidado de la salud.

- 20 En consecuencia, es otro objeto de la presente invención proporcionar un alimento funcional saludable que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto novedoso (KS534) aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum que contiene principios activos para la prevención o alivio de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

- 25 La expresión "un alimento funcional saludable" define en el presente documento el alimento funcional que tiene una funcionalidad mejorada tal como una funcionalidad física o una funcionalidad fisiológica mediante la adición del extracto de la presente invención a un alimento convencional para prevenir o mejorar las enfermedades deseadas en seres humanos o animales.

- 30 El otro objeto de la presente invención es proporcionar un alimento para el cuidado de la salud que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto novedoso (KS534) aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var subintegrum, junto con un aditivo nutricionalmente aceptable para la prevención o alivio de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

- 35 La expresión "un alimento para el cuidado de la salud" definida en el presente documento se refiere al alimento que contiene el extracto o uno o más compuestos de la presente invención sin efecto previsto específico pero con un efecto previsto general en una cantidad pequeña en forma de aditivo o en una cantidad completa en forma de polvo, gránulo, cápsula, píldora, comprimido etc.

- 40 La expresión "un aditivo nutricionalmente aceptable" definida en el presente documento comprende "cualquier sustancia cuyo uso previsto da como resultado o puede esperarse razonablemente que dé como resultado directa o indirectamente que se convierta en un componente o altere de otra forma las características de cualquier alimento", y se pueden clasificar en tres grupos según su origen, es decir, (1) aditivo químicamente sintetizado tales como cetonas, glicina, citrato de potasio, ácido nicotínico, etc.; (2) aditivos naturales tales como colorante de caqui, extracto de regaliz, celulosa cristalina, gua dum etc.; (3) el aditivo mezclado entre sí tal como L-glutamato sódico, conservantes, colorante de alquitrán etc., o diversas categorías según su función en el alimento, por ejemplo, agente espesante, agente de maduración, agente blanqueante, secuestrante, humectante, agente antiapelmazamiento, agentes clarificantes, agente de curado, emulsionante, estabilizante, espesante, bases y ácido, agentes espumantes, nutrientes, agente colorante, agente aromatizante, edulcorante, agente conservante, antioxidante, etc., que son bien conocidos en la materia o en la bibliografía anterior (véase, "Codex General Standard for Food Additives" (GSFA, Codex STAN 192-1995) en la página principal de GSFA Online: www.codexalimentarius.net/gsfaonline/index.html).

- 50 Si una sustancia se añade a un alimento con un fin específico en dicho 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 otra manipulación.

- 55 Las expresiones "alimentos para el cuidado de la salud o alimentos funcionales saludables" divulgados en el presente documento se pueden incluir en alimentos, bebidas saludables, suplementos dietarios etc., y se pueden formular como formas de dosificación farmacéutica tales como un polvo, gránulo, comprimido, suspensión, emulsión, jarabe, comprimido masticable, cápsula, bebida etc.; o la forma de alimento, por ejemplo, pan, torta de arroz, fruta seca, caramelo, chocolate, goma de mascar, helados, leche tal como leche con bajo contenido en grasa, leche con lactosa hidrolizada, leche de cabra, leche procesada, productos lácteos tales como leche fermentada, mantequilla, leche concentrada, crema de leche, aceite de mantequilla, queso natural, queso procesado, leche en polvo, lactosuero etc., productos cárnicos procesados tales como hamburguesas, jamón, salchichas, bacon etc., ovoproductos procesados, productos de pescado tales como tortas de pescado, productos de tipo *noodles* como *noodles* instantáneos, *noodles* secos, *noodles* húmedos, *noodles* fritos, *noodles* no fritos, *noodles* secos gelatinizados, *noodles* cocinados, *noodles* congelados, pasta etc., producto de té tal como bolsita de té, té lixiviado etc., bebidas saludables tales como bebidas de frutas, bebidas de hortalizas, refrescos carbonatados, bebidas de

soja, bebidas lácteas, bebidas mixtas, etc., aderezos alimentarios tales como salsa de soja, pasta de soja, pasta de pimiento rojo, chunjang (un tipo de producto de soja fermentado coloreado con caramelo), cheonggukjang (soja natural fermentada con *B. subtilis*), pasta mixta, vinagre, salsa, ketchup, curry, aderezos etc., margarina, *shortening*, pizza etc., pero no se pretende en el presente documento limitarlo a los anteriores, para prevenir o mejorar la enfermedad deseada.

Asimismo, el extracto o compuesto anteriormente descrito se puede añadir a un alimento o bebida para la prevención o mejora de la enfermedad deseada. La cantidad del extracto o de uno o varios compuestos anteriormente descritos a un alimento o bebida como alimento o bebida funcional puede generalmente estar comprendido de 0,01 al 100 % p/p de la composición alimenticia funcional para la salud. En particular, aunque la cantidad preferible del extracto de la presente invención en el alimento funcional saludable, alimento para el cuidado de la salud o alimento nutriente especial puede variar según el fin previsto de cada alimento, se utiliza preferentemente en general para usarse como aditivo en la cantidad del extracto o de uno o varios compuestos de la presente invención comprendidos de aproximadamente 0,01 al 5 % del alimento tales como *noodles* y similares, de 40 al 100 % en alimentos para el cuidado de la salud y del 100% de la composición alimenticia.

Siempre que la composición de bebida saludable de la presente invención contenga el extracto o uno o varios compuestos anteriormente descritos como el componente principal en la proporción indicada, no hay limitación especial sobre el resto de componentes líquidos, donde el resto de componentes pueden ser varios carbohidratos desodorantes o naturales etc. tal como una bebida convencional. Los ejemplos de los carbohidratos naturales anteriormente mencionados son monosacáridos tales como glucosa, fructosa etc.; disacáridos tales como maltosa, sacarosa etc.; azúcar convencional tal como dextrina, ciclodextrina; y alcoholes azucarados tales como silitol, y eritritol etc. Como el otro desodorante además de los anteriormente mencionados, un desodorante natural como taumatina, extracto de estevia tal como el leaudiósido A, glicirricina *et al.*, y desodorantes sintéticos tales como sacarina, aspartame *et al.*, se pueden usar favorablemente. La cantidad del carbohidrato natural anteriormente descrito está generalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 20 g, preferentemente de 5 a 12 g en la proporción de 100 *ml* de la presente composición de bebida.

Los otros componentes de la composición anteriormente mencionada son diferentes nutrientes, vitaminas, minerales o electrolitos, agente aromatizante sintético, agente colorante y agente mejorador en el caso de queso, chocolate *et al.*, ácido péctico y sales del mismo, ácido algínico y sales del mismo, ácido orgánico, adhesivo coloidal de protección, agente regulador del pH, estabilizante, conservante, glicerina, alcohol, agente de carbonización usado en bebidas carbónicas *et al.* El otro componente de los anteriormente mencionados puede ser zumo de frutas para preparar zumo natural, bebidas de zumo de frutas y bebidas de hortalizas, donde el componente se puede usar independientemente o en combinación. La proporción de los componentes no es tan importante, pero generalmente está comprendida de aproximadamente 0 al 20 % p/p por 100 % p/p de la presente composición. Los ejemplos de alimentos que pueden recibir adiciones que comprendan el extracto o composición son diversos alimentos, bebidas, gomas, complejos de vitaminas, alimentos que mejoran la salud y similares.

El extracto o uno o varios compuestos de la presente invención no tienen toxicidad ni efectos secundarios, por tanto; se pueden utilizar con seguridad.

Será evidente para el experto en la técnica que es posible realizar diversas modificaciones y variaciones en las composiciones, uso y preparaciones de la presente invención sin abandonar el ámbito de la invención.

La presente invención se explica de manera más específica en los siguientes ejemplos. Sin embargo, se deberá entender que la presente invención no se limita a estos ejemplos en forma alguna.

Efectos ventajosos de la invención

Tal como se describe en la presente invención, el compuesto novedoso de la invención (KS534) aislado del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrumsubintegrum* mostró una potente actividad antiinflamatoria, antialérgica, antiasmática y anti-COPD en diversos ensayos *in vitro*, por ejemplo, (1) ensayo citotóxico usando la línea de células HT1080, H292 y EL4, (2) un ensayo de inhibición de la expresión de MUC5AC (formación de moco oligomérico/gel) inducido por TNF-alfa, (3) ensayo indicador con luciferasa de NF-kappa B, (4) ensayo de inhibición sobre la actividad del factor de transcripción de NF-kappa B; (5) inhibición de la expresión del ARNm de genes diana tales como MMP-9, MUC5AC e IL-4 mediante la inhibición de la actividad de NF-kappa B; (6) efecto de inhibición dependiente de la dosis sobre la reproducción de MUC5AC en un ensayo de reproducción de la proteína MUC5AC; así como ensayos *in vivo*, por ejemplo, (7) efecto de reducir el número de células inflamatorias tales como eosinófilos usando un modelo de ratón sensibilizado/estimulado con OVA, (8) ensayo de inhibición sobre la liberación de IgE, citoquinas inflamatorias tales como IL-4, IL-5, IL-13 etc. en fluido BALF e invasión de células inflamadas, así como la supresión de la hipersensibilidad de las vías respiratorias e hiperplasia de las células de globo, (9) un ensayo de inhibición que utiliza un modelo animal de EPOC (ratón C57B/6N) sobre la proliferación de células inflamatorias en fluido BALF, la inhibición de la reproducción de ROS (especies reactivas de oxígeno), y la actividad de la elastasa de neutrófilos, el efecto de reducción del nivel de IL-6, TNF-alfa y las células inflamatorias infiltradas, etc.

Breve descripción de los dibujos

Los anteriores y otros objetos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que;

- 5 La Fig. 1 muestra la correlación ^1H - ^1H COSY y HMBC del compuesto KS534;
- la Fig. 2 muestra el efecto de la muestra de ensayo sobre la expresión de ARNm de MUC5AC usando qRT-PCR;
- 10 la Fig. 3 muestra el efecto de inhibición de la muestra de ensayo sobre la actividad de TNF-alfa inducida por NF-kappa B usando el ensayo indicador de la luciferasa (el análisis estadístico se realizó mediante la prueba de la t de Student y el valor P (**, <0,01) se consideró como estadísticamente significativo);
- 15 la Fig. 4 presenta el efecto de inhibición de la muestra de ensayo sobre el nivel de expresión de la proteína MUC5AC usando un método ELISA modificado (el análisis estadístico se realizó mediante la prueba de la t de Student y el valor P (**, <0,01 y ***, <0,001) se consideró como estadísticamente significativo);
- la Fig. 5 presenta el efecto del compuesto de la invención sobre el número de células inflamatorias en BALF;
- 20 la Fig. 6 presenta el efecto del compuesto de la invención sobre el número de citoquinas inflamatorias en BALF;
- la Fig. 7 presenta el efecto del compuesto de la invención sobre el número total de IgE y el nivel de IgE específica de OVA en suero;
- 25 la Fig. 8 presenta el efecto del compuesto de la invención sobre la respuesta inflamatoria en células del tejido pulmonar usando exploración histológica;
- la Fig. 9 presenta el efecto del compuesto de la invención sobre la hipersecreción de la mucosa en las células del tejido pulmonar usando exploración histológica;
- 30 la Fig. 10 presenta el efecto del compuesto de la invención sobre el número de células inflamatorias en BALF;
- la Fig. 11 presenta el efecto del compuesto de la invención sobre la reproducción de ROS en BALF;
- 35 la Fig. 12 presenta el efecto del compuesto de la invención sobre el nivel del contenido de BALF y la actividad elastasa en BALF;
- la Fig. 13 representa el efecto del compuesto de la invención sobre el nivel de IL-6 y TNF-alfa en BALF;
- 40 la Fig. 14 representa gráficamente el efecto del compuesto de la invención sobre la respuesta inflamatoria en células del tejido pulmonar usando exploración histológica;

Mejor modo de llevar a cabo la invención

- 45 Será evidente para el experto en la técnica que es posible realizar diversas modificaciones y variaciones en las composiciones, uso y preparaciones de la presente invención sin abandonar el espíritu o el ámbito de la invención.

La presente invención se explica de manera más específica en los siguientes ejemplos. Sin embargo, se deberá entender que la presente invención no se limita a estos ejemplos en forma alguna.

50 Ejemplos

Los siguientes Ejemplo de referencia, Ejemplos y Ejemplos experimentales tienen el fin de ilustrar adicionalmente la invención sin limitar su alcance.

55 Ejemplo de referencia 1. Aparato de análisis

- 60 El punto de fusión se determinó sin corrección mediante un aparato de determinación del punto de fusión (Koflermicrohostage); rotación óptica mediante un polarímetro Jasco P-1020; datos UV mediante un espectrómetro UV-VIS 2450; espectro FT-IR de Jasco FT/IR-4200; espectro de RMN con un espectrómetro Varian UNITY 400 MHz FT-NMR usando un patrón interno de TMS; HRESIMS con un espectrómetro Waters Q-TOF Premier; y análisis HPLC con un Gilson HPLC usando un detector UV/VIS-155 y una bomba 305 en el experimento.

Ejemplo 1. Preparación del compuesto novedoso (KS 534) a partir de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*1-1. Preparación del extracto bruto

2,0 kg de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* seco (cultivado en 244, Soimyeon Eumseong-gun Chungcheongbuk-do en Corea de acuerdo con GAP, KRIBB 0020697, banco de extracto de planta de KRIBB, Taejeon, Corea) 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 mediante extracción a temperatura de reflujo a 78 °C durante 12 horas para recoger el filtrado, tres veces. El extracto se filtró con papel de filtro para eliminar los residuos. El filtrado recogido se concentró en un evaporador rotatorio a presión reducida (EYELA, N-2100, Japón) a 55~65 °C a presión reducida y se secó con un criodesecador para obtener 198,7 g del extracto bruto seco.

1-2. Preparación del extracto purificado

20 g del extracto bruto seco se disolvieron en una mezcla de disolventes (MeOH al 25 % en agua) y se sometió a purificación adicional usando cromatografía preparativa en fase invertida (Zeoprep C18, 75 µm, 200 x 250 mm, Zeochem, Louisville, EE. UU.). Las fracciones en elución (f1-f4) se recogieron y se concentraron al vacío. 5,0 g de la fracción f2 se cargaron en una columna de cromatografía líquida de media presión (MPLC) usando la columna: RP C-18 (Zeoprep C18, 20 x 250 mm, 10 µm, Zeochem, Louisville, EE. UU.) y el disolvente de elución (solución de MeOH en agua = 2:8, 3:7, 4:6, 10:0) para dar 5 subfracciones, f2a, f2b, f2c, f2d y f2e.

1-3. Preparación del compuesto novedoso KS534

0,8 g de subfracción (f2c) se sometieron a HPLC semipreparativa (Synergy Polar-RP 4 µm, 21,2 x 250 mm, Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU., MeCN al 22 % en H₂O) para obtener el novedoso compuesto iridoide de color marrón brillante en polvo 3,4-dihidroxibenzoato de (3R,5S,5aS,6R,7S,8R,8aS)-8-cloro-8a-hidroxi-5-(2-hidroxiacetoxi) hexahidro-1H-3,6-metanociclopenta[e][1,3]dioxepin-7-ilo (KS534; C₂₂H₂₆ClO₁₃) que muestra las propiedades fisicoquímicas.

[α]_D²⁰ -30,0° (c 0,2, MeOH).

HRESIMS (m/z observado 533,1035 [M-H]): agrupación iónica cuasi-molecular 3:1

Espectro IR: 3412 cm⁻¹ (grupo hidroxilo); 1692 cm⁻¹, (éster carbonilo insaturado)

Espectros RMN ¹H y ¹³C: Tabla 1

Espectro ¹H-¹H COSY (Fig. 1)

Espectro NOESY (Fig. 1)

[Tabla 1]

Datos espectroscópicos de RMN ¹H (400 MHz) y ¹³C(100 MHz) para el KS-534 en DMSO-*d*₆

Posición	KS-534	
	δ c	δ _H (J en Hz)
Agluc		
1	90,6	5,55, d (1,6)
3	93,5	5,30, d (2,4)
4	32,9	2,38, dd (13,4, 8,2)
		1,94, dd (13,4, 2,4)
5	33,0	2,26, ddd (9,6, 8,8, 2,2)
6	85,7	4,96, dd (8,8, 2,2)
7	69,2	4,54, d (8,8)
8	78,3	
9	46,4	2,55, d a (10,0)
10	60,8	3,56, d (12,4)
		3,86, d (12,4)

(continuación)

Posición	KS-534	
	δ_c	δ_H (Jen Hz)
11		
Glc		
1'	96,8	4,50, d (7,6)
2'	73,0	2,91, d (8,4)
3'	76,5	3,13, m
4'	70,1	3,04, t (9,2)
5'	77,1	3,13, m
6'	60,9	3,69, d (8,8)
		3,43, dd (12,0, 5,6)
Aroilo		
1"	119,8	
2"	116,4	7,39, d (2,1)
3"	145,1	
4"	150,9	6,83, d (8,0)
5"	115,4	7,37, dd (8,0, 2,1)
6"	122,1	
7"	165,6	

Ejemplo experimental 1. Determinación preliminar de la citotoxicidad.

- 5 Para determinar la citotoxicidad del compuesto de la invención, se realizó un ensayo preliminar por el método divulgado en la bibliografía (Shiyama *et al.*, *Talanta*, **1997**, *44*, 1299-1305.; Tominaga *et al.*, *Anal. Commun.*, **1999**, *36*, 47-50).

1-1. Preparación de líneas celulares y cultivos celulares

- 10 Las células HT1080 (CRL-12012), H292 (CRL-1848) y EL4 de murino (TIB-39) se adquirieron de la empresa (American Type Culture Collection).

- 15 Las células HT1080 (CRL-12012) y EL4 de murino se cultivaron en medio DMEM (SB30243.01, medio de Eagle modificado por Dulbecco; DMEM, HyClone) suplementado con FBS al 10 % (suero de feto bovino; Gibco) y antibiótico (100 unidades/ml de penicilina + 100 unidades/ml de estreptomycin). Las células H292 se cultivaron en medio RPMI (SH30027.01, RPMI 1640, Gibco) suplementado con FBS al 10 % y antibióticos. Las células se cultivaron en condiciones de una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 % a 37 °C. PMA (P8139, 12-miristato 13-acetato de forbol) se adquirió de la empresa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y TNF- α es de la empresa (300-01A, PeproTech, NJ USA Inc.) a usar en el experimento.

1-2. Evaluación de la citotoxicidad en células H292

- 25 La línea de células H292, una línea de células de cáncer humano de mucosa pulmonar, se suspendió en medio RPMI suplementado con FBS al 10 % en una concentración de 5×10^4 células/ml, y 100 μ l de la suspensión se inocularon en placas de 96 pocillos para adherir las células a la placa durante 12 horas. Varias concentraciones de muestra de ensayo (compuesto KS 534) se trataron con lo anterior y se cultivaron durante 24 horas. 10 μ l de solución de CCK-8 se mezclaron con 90 μ l de medio y se añadieron 100 μ l de solución a cada pocillo. Tras reaccionar de 30 min a 4 horas, la absorbancia de la solución se determinó a 570 nm. La visibilidad celular se calculó
- 30 la siguiente fórmula matemática 1 basándose en el grupo del control negativo tratado con DMSO al 0,2 % y el resultado se muestra en la Tabla 2.

[Fórmula matemática 1]

- 35 Viabilidad celular (%) = DO 570 nm (grupo de ensayo) / DO 570 nm (grupo del control negativo) x 100

En el resultado, como se muestra en la Tabla 2, se ha confirmado que el compuesto KS 534 no presenta citotoxicidad en las células H292 a menos de 20 μ M.

40

[Tabla 2]

Muestra de ensayo	concentración (μM)	viabilidad de células H292 (% , media $\pm$ variación)
Grupo del control negativo	0	100,00 $\pm$ 2,50
KS-534	2,5	101,88 $\pm$ 3,71
	5	102,46 $\pm$ 3,96
	10	99,89 $\pm$ 4,79
	20	97,87 $\pm$ 2,92

Ejemplo experimental 2. Inhibición de la expresión de MUC5AC.

- 5 Para determinar el efecto inhibidor sobre la expresión de MUC5AC inducido por TNF-alfa en la línea de células H292, se llevó a cabo el siguiente ensayo:

2-1. determinación del nivel de expresión de ARNm

- 10 El aislamiento del ARN total, síntesis de ADNc y PCR en tiempo real cuantitativa se realizaron por los métodos divulgados en la bibliografía (Kim *et al.*, *J. Cell. Biochem.* 2008, 104, 1906-1917).

En resumen, el ARN total se aisló usando el reactivo TRIzol (155596-026, Life Technologies) y la primera hebra de ADNc se sintetizó usando enzimas (Omniscript Reverse Transcriptase, 205113, Qiagen, CA). La amplificación por

15 PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo usando el aparato 1 (S1000 Thermal cycler, Biorad, EE.UU.) y el aparato 2 (2 x Greenstar master mix, Bioneer, Corea) de acuerdo con el manual del fabricante.

2-2. Efecto sobre la expresión de MUC5AC

- 20 Para determinar el efecto inhibidor sobre la expresión de MUC5AC inducido por TNF-alfa en la línea de células H292, se llevó a cabo el siguiente ensayo.

El efecto inhibidor del compuesto KS534 sobre la expresión del ARNm de MUC5AC se determinó para verificar la actividad de tratamiento o prevención de enfermedades inflamatorias tales como la EPOC.

- 25 Específicamente, la cantidad reproducida de TNF-alfa inducida por MUC5AC se determinó mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real), reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) e inmunoensayo MUC5AC. Las células H292 se inocularon en placas de 48 pocillos en una concentración de 2×10^4 células/pocillo para adherirse durante 24 horas y el medio de cultivo se sustituyó por medio
- 30 nuevo que contenía FBS al 0,1 % para cultivar durante 24 horas. KS-534 10 μM se trató con lo anterior durante 2 horas y TNF-alfa 20 ng/ml se trató con lo anterior para cultivar durante 12 horas.

Para extraer el ARN total, el ARN se extrajo usando Trizol B (Invitrogen) y el ADNc se sintetizó usando el kit Omniscript RT (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemania) después de la cuantificación. El ADNc sintetizado se mezcló con el molde, los cebadores MUC5AC y GAPDH como se muestra en la Tabla 3, respectivamente, y se llevó a cabo la PCR usando la mezcla de PCR (PCR Master Mix, Bioneer, Corea) de la siguiente forma: 5 min a 94 °C, 1 ciclo para predensnaturalización; 30 s a 95 °C, 45 s a 60 °C y 45 s a 72 °C, 30 ciclos para desnaturalización; 10 min a 72 °C, 1 ciclo para extensión final.

- 40 [Tabla 3]

Gen (especie)	cebador	
MUC5AC (humano)	sentido directo	5`-TGA TCA TCC AGC AGC AGG GCT-3`
	sentido contrario	5`-CCG AGC TCA GAG GAC ATA TGG G-3`
GAPDH (Humano)	sentido directo	5`-CGG AGT CAA CGG ATTT GGT CGT AT - 3`
	sentido contrario	5`-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3`

En el resultado, se ha confirmado que la cantidad de MUC5AC aumentó en el grupo de control tratado con TNF-alfa y que la cantidad de expresión de ARNm de MUC5AC en el grupo tratado con 10 μM disminuyó en un 58,47 % (relación inhibidora de KS-534 sobre la expresión de MUC5AC: 41,52 %) como puede observarse en la Tabla 4 y la Fig. 2.

- 45

En consecuencia, se ha comprobado que el compuesto KS-534 inhibe la expresión génica de MUC5AC y es útil para tratar la EPOC.

[Tabla 4]

5

El resumen de la actividad inhibidora de la expresión del ARNm de Muc5AC mediante KS-534

muestra	concentración (µM)	TNF-α (20 ng/ml)	Nivel expresado de ARNm de MUC5AC (% Relativo que lo compara con el del grupo de tratamiento de TNF-alfa)	Relación de inhibición (%)
Control negativo	0	-	7,02 ± 2,82	92,82
tratamiento con TNF-alfa	0	+	100,00 ± 25,35	0,00
KS-534	10	+	58,47 ± 18,50	41,52

Ejemplo experimental 3. Inhibición de la actividad de NF-kappa B.

10

Para determinar el efecto inhibidor sobre la actividad de NF-kappa B, se llevó a cabo el siguiente ensayo:

3-1. Ensayo indicador con luciferasa de NF-kappa B

15 Se llevó a cabo el ensayo indicador con luciferasa de NF-kappa B siguiendo el procedimiento divulgado en la bibliografía (Pulin Che *et al.*, *Assay Drug Dev. Technol.*, **2012**, 10, 61-68).

Para establecer las células estables para el ensayo indicador con luciferasa de NF-kappa B, el elemento de respuesta luciferasa de NF-kappa B se clonó en el vector (pGL4.32vector, E849A, Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se infectó la célula (células H292, CRL-1848, ATCC) usando Lipofectamine 2000 (11668-019, Invitrogen). La célula infectada se seleccionó usando higromicina (400 µg/ml) durante 2 semanas y las colonias se clonaron individualmente y se proliferaron. La célula se introdujo en las placas de 96 pocillos en una concentración de 5×10^3 células/pocillo durante 24 horas. La muestra de ensayo se pretrató a una concentración predeterminada y 20 ng/ml de TNF-alfa se trataron con la anterior durante 12 horas. La actividad de la enzima luciferasa se determinó con el kit E6110 (OneGlo Luciferase Assay kit, Promega) y se usó DMSO como control con vehículo.

3-2. Efecto inhibidor sobre la activación del factor de transcripción de NF-kappa B

30 Se ha notificado que el TNF-alfa activan el factor de transcripción de NF-kappa B para inducir la expresión de MUC5AC (Busse, P. J. *et al.*, *J. Allergy Clin. Immun.*, **2005**, 116, 1256-1263.; Smirnova, M. G. *et al.*, *Cytokine*. 2000, 12, 1732-1736).

35 Basándose en el efecto inhibidor del compuesto KS534 sobre la expresión de MUC5AC, los inventores han estudiado para confirmar si la actividad del factor de transcripción de NF-kappa B presentado en el promotor de MUC5AC está inhibido por el compuesto KS-534.

Las células H292 establecidas de forma estable, una célula del epitelio bronquial humano normal, con el vector indicador de la luciferasa pGL4.32 (luc2P/NF-κB-RE/Hygro, Promega Company) se establecieron antes del siguiente experimento. Las células se suspendieron en medio que contenía DMEM al 10 % (Hyclone Company) en una concentración de 5×10^4 células/ml y cada 100 µl de células se sembraron en placas de 96 pocillos para adherirse durante 12 horas a las placas. El medio se sustituyó por medio nuevo que contenía FBS al 0,1 % para cultivar durante 12 horas y KS-534 10 µl se trató durante 2 horas. 20 ng/ml de TNF-alfa se trataron con la anterior para cultivar durante 12 horas. El grado de activación de la luciferasa se determinó en un sistema experimental One-glow Luciferase Assay (Promega Company). Tras retirar todo el medio de cultivo de la placa de pocillos, la placa se lavó dos veces con solución de PBS y se añadieron 60 µl de tampón de lisis pasiva (PLB) a cada pocillo para lisar las células durante 30 min. 50 µl de la solución lisada de la célula se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos y se añadieron al anterior 50 µl de reactivo LAR II que contiene el sustrato de luciferasa de luciérnaga. La luminiscencia se determinó en un Microplate Luminometer LB 96V (EG&G Berthold company) durante 0,5 s y los resultados se muestra en la Tabla 5, y la Fig. 3.

50

[Tabla 5]

El resumen de la velocidad de inhibición de la actividad de NF-kappa B por KS-534

muestra	Conc.(μM)	TNF-alfa (20 ng/ml)	actividad de NF-kappa B (% relativo en comparación con el grupo de tratamiento con TNF-alfa)	Relación de inhibición (%)
Control negativo	0	-	34,05 ± 1,99	-
tratamiento con TNF-alfa	0	+	100,00 ± 6,22	0,00
KS-534	10	+	63,35 ± 6,18	36,65

En el resultado, se ha confirmado que el grupo de ensayo tratado con KS-534 10 μM KS-534 mostró un potente efecto inhibidor de un 63,35 % (relación de inhibición del KS-534; 36,65 %) basado en la actividad de NF-kappa B inducida por TNF-alfa (100 %).

En consecuencia, se ha comprobado que el compuesto KS-534 inhibió significativamente la actividad del factor de transcripción de NF-kappa B.

10 Ejemplo experimental 4. Inhibición de la reproducción de la proteína MUC5AC.

Para determinar el efecto inhibidor sobre la reproducción de la proteína MUC5AC, se realizó el siguiente ensayo por el método divulgado en la bibliografía (Sikder, MA. *et al.*, *Phytother. Res.*, **2014**, 28, 62-68)

15 4-1. Efecto inhibidor sobre la reproducción de la proteína MUC5AC

Para determinar la actividad de tratamiento de las enfermedades inflamatorias, tales como EPOC, se determinó el efecto inhibidor sobre la liberación de MUC5AC de la siguiente forma:

20 Para el inmunoensayo de la MUC5AC reproducida, 50 μl de sobrenadante recogido del Ejemplo experimental 3 se distribuyeron en una placa de 96 pocillos y se secó en un termostato a 50 °C.

Tras lavar con una solución de PBS a la que se había añadido 1 % de BSA, se añadió el anticuerpo de MUC5AC (ab3649, abcam Co.) para reaccionar conjuntamente a temperatura ambiente durante 1 hora y posteriormente se añadió al anterior el anticuerpo secundario para reaccionar conjuntamente durante 1 hora. Después de volver a lavar, una solución de peróxido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (54827-17-7, Sigma-aldrich) se añadió a lo anterior para reaccionar conjuntamente durante 20 min. Tras detener la reacción por adición de una solución de ácido sulfúrico, la absorbancia se determinó en un lector de microplacas VERSAmax, (SMP500-14915, Molecular Devices, EE.UU.) a 450 nm (Sikder, M. A. *et al.*, *Phytother. Res.*, **2014**, 28, 62-68; Takeyama, K. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, 96, 3081-3086). El resultado se muestra en la Tabla 6 y en la Fig. 4.

En el resultado, se ha confirmado que la cantidad secretada de MUC5AC en el grupo tratado con TNF-alfa aumentó significativamente y el grupo de ensayo tratado con KS-534 2,5, 5 y 10 μM mostró un potente efecto inhibidor del 93,38, 78,27 y 64,77 % (relación de inhibición del KS-534; 6,62, 21,73 y 35,23 %) sobre la reproducción de MUC5AC en función de la cantidad secretada de MUC5AC en el grupo tratado con TNF-alfa (100 %).

[Tabla 6]

El resumen de la actividad inhibidora de la secreción de Muc5AC mediante KS-534

muestra	Conc. (μM)	TNF-alfa (20 ng/ml)	secreción de MUC5AC (% Relativo que lo compara con el del grupo de tratamiento de TNF-alfa)	Relación de inhibición (%)
Grupo del control negativo	0	-	25,98 ± 0,88	-
TNF-alfa tratamiento	0	+	100,00 ± 1,22	0,00
KS-534	2,5	+	93,38 ± 0,90	6,62
	5	+	78,27 ± 2,16	21,73
	10	+	64,77 ± 1,56	35,23

Ejemplo experimental 5. Actividad antiasmática en un modelo animal de asma inducida.

Para determinar la actividad antiasmática en la muestra de ensayo en un modelo animal de asma inducida, se realizó el siguiente ensayo por el método divulgado en la bibliografía (Shin, I. S. *et al.*, *Food Chem. Toxicol.*, **2013**, 62,

506-513)

5-1. Sensibilización de los animales y estímulo de las vías respiratorias

5 Ratones BALB hembras exentas de patógenos específicos (aproximadamente 20 g), de 6 semanas de edad, que se habían cribado serológicamente de forma rutinaria para determinar patógenos respiratorios relevantes, se adquirieron de Samtako Co. (Seul, Corea) y se aclimataron al ambiente experimental en condiciones controladas de temperatura de 22 ± 2 °C, y humedad relativa de 55 ± 15 °C, un ciclo de luz/oscuridad durante 1 semana antes del experimento.

10 En resumen, los ratones se sensibilizaron mediante inyección intraperitoneal de 20 µg de OVA (ovoalbúmina; A5503, Sigma, St. Louis, MO), que se emulsionó en 2 mg de hidróxido de aluminio (A8222, Sigma-Aldrich, MO. EE.UU.) en 200 µl de tampón PBS (pH 7,4), quincenalmente. Los ratones se estimularon por las vías respiratorias con OVA (al 1 % en PBS) durante 30 min usando un nebulizador ultrasónico (NE-U12; Omron Corp., Tokio, Japón) desde el 21º día al 23º día después de la sensibilización inicial. 24 h después del tratamiento con el antígeno, se determinó la hipersensibilidad de las vías respiratorias y los ratones se sacrificaron 48 h después del último estímulo. Los ratones se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital (50 mg/kg, Entobal®, Hanil, Corea) 48 h después del último estímulo, y se practicó una traqueotomía. Tras instilar 1,4 ml de solución salina fisiológica (PBS) a los pulmones, se obtuvo el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) mediante aspiración tres veces mediante canulación traqueal.

20 Los grupos se dividieron en varios grupos, es decir, (a) grupo de control normal (NC): los grupos tratados o no tratados con OVA; (b) grupo con asma inducida (OVA): los grupos tratados con OVA para inducir el asma; y (c) grupo comparativo: los grupos tratados con el grupo de control positivo (M30, montelukast; 30 mg/kg, PO, Sigma-Aldrich Co. Ltd., SML-0101+OVA) y (d) grupo de la muestra de ensayo: los grupos tratados con el compuesto KS534 (30 mg/kg, PO, Sigma-Aldrich Co. Ltd., SML-0101+OVA).

El grupo de ensayo consistió en 7 ratones para cada grupo y varias concentraciones de la muestra de ensayo se administraron por vía oral al ratón desde el 21º al 23º días después de 1º tratamiento con OVA.

30 Todos los resultados obtenidos de los diferentes experimentos se registraron como media $\pm$ SD (desviación estándar) y las comparaciones entre cada grupo se determinaron usando una prueba de ANOVA monolateral usando el programa SPSS 10.0. La significación estadística entre cada grupo se determinó según las pruebas de comparación múltiple de Dunnett como prueba post-hoc. El resultado fue expresado como valores P: < 0,05 (*) como estadísticamente significativos.

5-2. Aislamiento de BALF y determinación del inmunocito

El sobrenadante del fluido de lavado broncoalveolar (BALF) recuperado de cada ratón se aisló con una centrifuga y se mantuvo en la nevera para determinar el nivel de células inflamatorias.

40 BALF se cargó sobre un porta y se centrifugó para fijar las células sobre el porta usando una máquina Cellspin (Cytol2.5+clip5, Hand Science Industrial, Corea). Las células se tiñeron con los reactivos Diff-Quick® Stain (Sysmex, n.º de Cat. 38721), Suiza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el número de células inflamatorias de cada muestra se contó al microscopio (x400).

45 Como se muestra en la Fig. 5, el número total de eosinófilos y células inflamatorias en el grupo de control tratado y que inhaló OVA como grupo de asma inducida (OVA) aumentó significativamente comparándolos con los incluidos en el grupo sin tratamiento con OVA con el grupo de control normal (NC).

50 El número total de eosinófilos y células inflamatorias en el grupo de la muestra de ensayo que recibió la administración oral de varias concentraciones de muestra de ensayo se redujo significativamente.

5-3. Análisis del nivel de citoquinas en BALF

55 Para confirmar el efecto de inhibición de las muestras de ensayo sobre el nivel de las citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) en el fluido de lavado broncoalveolar (BALF), el nivel de las citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) en el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) se determinó usando un kit ELISA (VersaMax, Molecular Devices, EE.UU.) que reaccionaba específicamente con cada citoquina de acuerdo con el manual del fabricante.

60 Como se muestra en la Fig. 6, el nivel de las citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) en el grupo de control tratado OVA como grupo de asma inducida (OVA) aumentó significativamente comparándolos con los incluidos en el grupo sin tratamiento con OVA con el grupo de control normal (NC).

65 El mayor nivel de las citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) en el grupo de control positivo tratado con Montelukast (MO, 30 mg/kg) así como el grupo de la muestra de ensayo que recibió por vía oral varias concentraciones de muestras de ensayo (KS534) se redujo significativamente.

5-4. Efecto sobre el nivel de IgE e IgE específica de OVA en suero sanguíneo

Para confirmar el efecto de inhibición de las muestras de ensayo preparadas en los Ejemplos sobre el nivel de IgE e IgE específica de OVA en suero sanguíneo, se realizó el siguiente ensayo ELISA por el método divulgado en la bibliografía (Shin., A.B., *N. Engl. J. Med.*, **2001**, 344, 30-37).

El suero sanguíneo aislado de la vena cava caudal preparado anteriormente se recuperó para determinar el nivel de IgE e IgE específica de OVA en suero sanguíneo.

El suero sanguíneo se añadió a placa de 96 pocillos (ELISA plate, 2592, Costa, EE.UU.) y se revistió con solución tamponadora de NaHCO_3 0,1 M (pH 8,3) que contenía 20 $\mu\text{g/ml}$ de OVA (Sigma, MO, EE.UU.) de 4 a 16 horas. Tras inhibir la reacción no específica usando PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1 % (P2007, Biosesang, Corea), el suero de ensayo se diluyó a 1:400 y se hizo reaccionar conjuntamente durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS que contenía tween 20 al 0,05 %, el suero se hizo reaccionar con anticuerpo monoclonal diluido (x300) dirigido contra IgE de ratón (MCA419, Serotec, Oxford, Reino Unido) durante 2 horas con anticuerpo policlonal de cabra diluido (x4000) dirigido contra IgG de rata (432402, Biolegend, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el lavado, la solución se tiñó con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (432402, Biolegend Ins, EE.UU.) como sustrato y la reacción se detuvo con H_2SO_4 2 N para determinar el valor de la absorbancia mediante espectroscopía (Versamax, Molecular Devices, US) a 450nm.

Como se muestra en la Fig. 7, el nivel de IgE e IgE específica de OVA en suero sanguíneo en el grupo tratado con OVA como grupo con asma inducida (OVA) aumentó significativamente, mientras que el del grupo de control positivo tratado con Montelukast (MO) así como el grupo de la muestra de ensayo que recibió por vía oral varias concentraciones de muestras de ensayo (KS-534) disminuyó significativamente.

5-5. Histología de los pulmones

Para confirmar el efecto antiasmático de las muestras de ensayo preparadas en los Ejemplos, a continuación se realizó el análisis histopatológico del tejido broncoalveolar según el método divulgado en la bibliografía (Kwak YG. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **2003**, 111, 1083-1092).

Los tejidos pulmonares suministrados de los ratones BALB/c que no se habían sometido a lavado broncoalveolar se fijaron durante 24 h en formalina tamponada neutra al 10 %. Tras incluirse en epoxi, se realizaron secciones de 4 μm de espesor, el tejido se tiñó con solución H&E (hematoxilina; Sigma MHS-16 y eosina, Sigma HT110-I-32) para observar la inflamación del tejido pulmonar y con ácido periódico de Schiff (PAS, IMEB Inc., EE.UU.) para observar la secreción mucosa en el tejido pulmonar. El cambio patológico en el tejido pulmonar se determinó mediante microscopía óptica.

Como se muestra en la Fig. 8, se descubrieron muchas células inflamatorias incluidos eosinófilos en los alrededores bronquiales y también se descubrió hiperplasia de células epiteliales así como hipertrofia muscular de la tráquea en el grupo de control tratado con OVA como grupo de asma inducida (OVA) mientras que la invasión de las células inflamadas se redujo significativamente en el grupo de control positivo tratado con Montelukast (MO, 30 mg/kg) así como en el grupo de la muestra de ensayo que recibió oralmente varias concentraciones de muestras de ensayo (KS 534).

Como se muestra en la Fig. 9, la secreción mucosa desde las células de globo de las células epiteliales bronquiales del tejido pulmonar aumentó de forma muy notable en el grupo de control tratado con OVA como grupo de asma inducida (OVA) mientras que la secreción mucosa desde las células de globo de las células epiteliales bronquiales del tejido pulmonar se redujo significativamente en el grupo del control positivo tratado con Montelukast (MO, 30 mg/kg) así como el grupo de la muestra de ensayo que recibió oralmente varias concentraciones de muestras de ensayo (KS 534).

En resumen, el compuesto KS534 de la invención podría prevenir o tratar diversas enfermedades tales como asma producida por OVA. El compuesto KS534 de la invención inhibió eficazmente la filtración de células inflamatorias incluidos eosinófilos, la reproducción de Th2 de tipo IL-4, 5, 13 así como redujo el nivel de IgE y la reproducción de IgE específica de OVA, lo que se confirmó mediante el análisis histopatológico del tejido broncoalveolar.

En conclusión, se ha confirmado que el compuesto KS534 de la invención alivió eficazmente el síndrome principal del asma tal como la eosinofilia, inflamación pulmonar, hipersecreción de mucosidad así como inhibición de la respuesta inmunitaria y, por tanto, puede ser útil como potente agente de tratamiento natural para el asma ya que tiene una eficacia equivalente o similar a la del fármaco químico convencionalmente disponibles, montelukast.

Ejemplo experimental 6. Ensayo en un modelo animal

Para determinar el efecto anti-EPOC de los compuestos de la invención en un modelo animal de la EPOC, se llevó a cabo el siguiente ensayo usando ratones con EPOC inducida como se divulga en la bibliografía (Bhavsar, T. *et al.*, *J.*

Chronic Obstr. Pulm. Dis.,2008, 3, 477-481).

6-1. Experimentos animales

- 5 Ratones C57BL/6N machos exentos de patógenos específicos (aproximadamente 22-24 g), de 6 semanas de edad, que se habían cribado serológicamente de forma rutinaria para determinar patógenos respiratorios relevantes, se adquirieron de Koatech Co. (www.koatech.co.kr, Seúl, Corea) y se criaron con acceso libre al alimento (sin antibióticos, Samyang Oil & Feed Corp., Corea) y agua en un animalario con un control de la temperatura de 22 ± 2 °C, y humedad de 55 ± 15 % con un ciclo de luz-oscuridad durante 12 horas y se aclimataron al entorno experimental durante 1 semana.

6-2. Fármaco y administración

(1) muestra de ensayo

- 15 2 tipos de muestras de ensayo, es decir, KS534 (15 y 30 mg/kg), Daxas (ingrediente principal: Roflumilast, 10 mg/kg) se disolvieron carboximetilcelulosa de sodio al 0,5 % (C9481, Sigma-Aldrich, EE.UU.) y se usaron como muestras de ensayo.

20 (2) administración

KS534, y Roflumilast (ROF II-492, HETERO, India) se administraron por vía oral a la de los ratones, 1 hora antes de la instilación intratraqueal (i.t.).

6-3. Preparación del modelo de EPOC en ratones

(1) cigarrillo convencional

- 30 3R4F Kentucky Reference Cigarettes (Universidad de California, EE.UU.) se usó como cigarrillo convencional para generar humo del tabaco. El cigarrillo contenía 9,4 mg de alquitrán, 11 mg de TPM (materia particulada total) y 12 mg de monóxido de carbono por unidad, se usó después de equilibrado de temperatura de 22 ± 1 °C y humedad del 60 ± 2 % tras su abertura durante 48 ~ 72 h.

(2) Procedimiento

- 35 La exposición al humo del tabaco se realizó usando un generador de humo de cigarrillo (DBL Co. Ltd., www.dhbio1ink.com. Corea). Los ratones se dividieron en cinco grupos: normal (NC), COPD (humo de cigarrillos con instilación intranasal LPS), Rof (10 mg/kg de roflumilast, p.o. + humo de cigarrillo con instilación intranasal LPS), y KS534-15 y 30 (15 mg/kg y 30 mg/kg de KS534, p.o. + humo de cigarrillo con instilación, respectivamente). La exposición al humo de cigarrillo (una pulverización/min, 35 ml de volumen por pulverización durante 2 s, cada 60 s, 8 cigarrillos al día) se llevó a cabo utilizando un generador de humo de cigarrillo. Los ratones recibieron 1 h de exposición al humo de cigarrillo en una cámara de exposición (50 cm x 30 cm x 30 cm) durante 3 días. Roflumilast y picroside C se administraron a ratones mediante sonda nasogástrica 1 h antes de la exposición al humo de cigarrillo durante 3 días. LPS se instalaron intranasalmente (10 µg disueltos en 50 µl de agua destilada) bajo anestesia 1 h después de la exposición final al humo de cigarrillo. Tras finalizar el experimento, la sangre, BALF, y neumocitos de cada rata se aislaron y se recogieron para ensayo.

6-4. Aislamiento de BALF y determinación del número de inmunocitos

- 50 Tras finalizar el experimento, las ratas se anestesiaron con Zoletil50 (3VX9, Virbac, Francia, p.o) y la sangre se administró mediante las venas caudales. Para aislar el BALF de los pulmones, el bronquio del pulmón derecho se ligó con sutura y después se preformó para traqueotomía. Un catéter de uso IV (16 GA, 3S-Cath, Dukwoo, Corea) se introdujo en el bronquio, y tanto el bronquio y catéter (16 GA, 3S-Cath, Dukwoo, Corea) se fijaron con sutura. El inyector que contenía 1 ml de DPBS 0,7 (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, Invitrogen, EE.UU.) se conectó al anterior y el DPBS se forzó a circular tres veces para aislar el BALF. El pulmón derecho ligado con sutura se aisló, se fijó con una solución de formalina neutra al 10 %, y el resto de tejido pulmonar se guardó en la nevera a -70 °C. El BALF aislado se centrifugó durante 15 min a 1500 rpm para preparar el aglomerado celular y el sobrenadante se guardó en la nevera a -70 °C para el análisis de citoquinas. El aglomerado celular se suspendió en DPBS, y las células se unieron a un porta de vidrio usando una centrifuga cytospin (CS03270047, Hand, Corea). La tinción Diff-Quik (ZS1003, Sysmex, Japón) se llevó a cabo y la célula se observó con microscopía óptica (DM1000, Leica, Alemania) para contar el número de inmunocitos en cada muestra de ensayo.

- 65 Como se muestra en la Fig. 10, el nivel característico de neutrófilos en BALF se observó en el grupo con EPOC inducida. El grupo de control de fármaco tratado con Roflumilast mostró un nivel reducido de neutrófilos de aproximadamente un 21,1 % en comparación con el grupo con EPOC inducida. En un momento, los grupos tratados con 15 mg/kg y 30 mg/kg de KS534 mostró un nivel notablemente reducido de neutrófilos del 26,3 % y 25,7 %, respectivamente.

respectivamente, en comparación con el grupo con EPOC inducida.

6-5. Efecto de ROS y actividad de la elastasa de neutrófilos en BALF

El nivel de ROS en BALF aislado de ratones se determinó mediante DCF-DA (dihidrodo cloro indiacetato fluorescente, 35854, Sigma-Aldrich, EE.UU.) y la concentración final de DCF-DA se ajustó a 20 μ M en 200 μ l para incubar durante 30 min. La fluorescencia se determinó con un aparato (Flexstation3, Molecular Device, EE.UU.). La actividad de la elastasa de neutrófilos en BALF se determinó usando N-succinil-(Ala)3-p-nitroanilida (S4760, Sigma-Aldrich) como sustrato, y se incubó durante 90 min. La absorbancia resultante se determinó a 405 nm.

Como se muestra en la Fig. 11, la reproducción de ROS (especies reactivas de oxígeno) en BALF aumentó de forma muy importante en el grupo con EPOC inducida. Sin embargo, el grupo de control de fármaco tratado con Roflumilast mostró un nivel reducido de ROS de aproximadamente un 22,2 % en comparación con el grupo con EPOC inducida y los grupos tratados con 15 mg/kg y 30 mg/kg de KS534 mostraron un nivel notablemente reducido de ROS de 19,5 % y 27,5 % en comparación con el grupo con EPOC inducida.

Como se muestra en la Fig. 12, en el grupo con EPOC inducida, el nivel de proteínas aumentó de forma notable en el BALF. El grupo de control de fármaco tratado con Roflumilast mostró una reducción significativa en el nivel de proteínas en comparación con el grupo con EPOC inducida. Los grupos tratados con 15 mg/kg y 30 mg/kg de KS534 mostraron un nivel notablemente reducido de proteínas del 20,8 % y 28,5 % en comparación con el grupo con EPOC inducida.

Como se muestra en la Fig. 12, en el grupo con EPOC inducida, la actividad de la enzima elastasa de neutrófilos aumentó notablemente en BALF. El grupo de control de fármaco tratado con Roflumilast mostró una reducción significativa en la actividad de la elastasa de neutrófilos en comparación con el grupo con EPOC inducida. Los grupos tratados con 15 mg/kg y 30 mg/kg de KS534 mostraron un nivel notablemente reducido de la actividad de la enzima elastasa de neutrófilos con grupo con EPOC inducida.

6-6. Análisis de citoquinas de BALF

El análisis de IL-6 (SM6000B, R&D System, EE.UU.) y TNF-alfa (555268, BD Bioscience, EE.UU.) en BALF aislado de ratones se determinó mediante enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA). El análisis de cada citoquina se realizó de acuerdo con el manual del fabricante y la absorbancia se determinó a 450 nm mediante ELISA leader (VersaMax, Molecular Devices, EE.UU.).

Como se muestra en la Fig. 13, en el grupo con EPOC inducida, el nivel de IL-6 aumentó de forma notable en el BALF. El grupo de control de fármaco tratado con Roflumilast mostró una reducción significativa del nivel de IL-6 en comparación con el grupo con EPOC inducida y los grupos tratados con 15 mg/kg y 30 mg/kg de KS534 mostraron un nivel reducido de IL-6 de 35,8 % y 50,6 % en comparación con el grupo con EPOC inducida. El nivel de TNF-alfa en BALF aumentó de forma notable en el grupo con EPOC inducida. El grupo de control de fármaco tratado con Roflumilast mostró una reducción significativa del nivel de TNF-alfa en comparación con el grupo con EPOC inducida y los grupos tratados con 15 mg/kg y 30 mg/kg de KS534 mostraron un nivel reducido de TNF-alfa del 18,3 % y 27,6 % en comparación con el grupo con EPOC inducida.

Como se muestra en la Fig. 14, la invasión de las células inflamadas aumentó significativamente en los alrededores bronquiales y también se descubrió hiperplasia de células epiteliales así como hipertrofia muscular de la tráquea en el grupo con EPOC inducida mientras que la invasión de las células inflamadas se redujo significativamente en el grupo de control positivo tratado con Roflumilast así como el grupo de muestra de ensayo (30 mg/kg, KS534) administrado por vía oral con diversas concentraciones de muestras de ensayo (KS 534).

En resumen, el nivel de IL-6 y TNF-alfa en BALF así como el número de células inflamatorias aumentaron de forma notable en el grupo con EPOC inducida y la reproducción de ROS y la actividad de la elastasa aumentaron de forma notable en el grupo con EPOC inducida. En un momento, el compuesto KS534 de la invención redujo eficazmente el número de mediadores inflamatorios tales como neutrófilos y citoquinas inflamatorias tales como IL-6 y TNF-alfa, que se confirmó mediante el análisis histopatológico del tejido broncoalveolar.

En conclusión, se ha confirmado que el compuesto KS534 de la invención inhibió eficazmente la mayoría de los síndromes patológicos de la EPOC en comparación con el fármaco convencionalmente disponible (Roflumilast) usado como grupo de control positivo que no mostró una reducción significativa en la actividad de la elastasa. En consecuencia, el compuesto KS534 de la invención puede ser útil como un potente agente natural para el tratamiento de la EPOC.

6-7. estadísticas

Todos los resultados obtenidos en los diversos experimentos se determinaron usando una prueba ANOVA monolateral, y la significación estadística entre el respectivo grupo se comprobó con la prueba de comparación

múltiple de Dunnett para la comparación de resultados post hoc.

Ejemplo experimental 7. Ensayo de toxicidad aguda para administración oral a ratas

- 5 El ensayo de toxicidad aguda se realizó por administración del compuesto de la invención a ratas Sprague Dawley SPF de 6 semanas de edad.

250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg, 5000 mg/kg de los compuestos de la invención se administró por vía oral a cada grupo que consistía en 2 ratas y los síntomas de las ratas se observaron durante 14 días. Tras administrar el
10 extracto o los compuestos, se observaron todos los cambios clínicos es decir, mortalidad, signos clínicos, cambios de peso corporal y se realizaron análisis de sangre tales como pruebas hematológicas y pruebas bioquímicas hematológicas. Los cambios anómalos en órganos abdominales y órganos torácicos se observaron después de la autopsia.

- 15 No se observaron ningún cambio en la mortalidad, signos clínicos, cambios en el peso corporal y hallazgos importantes en cualquier grupo o cualquier género. Además, no se mostró ninguna toxicidad en el grupo de ensayo tratado con 5000 mg/kg de extracto inventivo o compuestos.

20 En consecuencia, se ha confirmado que los compuestos de la invención preparados en la presente invención fueron sustancias potentes y seguras que muestran una DL₅₀ (más de 5000 mg/kg) en administración oral.

Modo de la invención

- 25 A partir de ahora en el presente documento, se van a describir los métodos de formulación y los tipos de excipientes, pero la presente invención no se limita a los mismos. Los ejemplos de preparación representativos se han descrito de la siguiente forma.

Preparación de inyección

- 30 KS534 ----- 100 mg
Metabisulfito de sodio ----- 3,0 mg
Metil parabeno ----- 0,8 mg
Propil parabeno ----- 0,1 mg
Agua destilada para inyección ----- cantidad óptima
35 La preparación para inyección se preparó disolviendo el principio activo, controlando el pH a aproximadamente 7,5 y posteriormente introduciendo todos los componentes en un recipiente de 2 ml y esterilización por un método convencional de preparación de inyecciones.

Preparación de polvo

- 40 KS534 ----- 500 mg
Almidón de maíz ----- 100 mg
Lactosa ----- 100 mg
Talco ----- 10 mg
45 La preparación del polvo se realizó mezclando los componentes anteriores y rellenando envases precintados.

Preparación de comprimido

- 50 KS534 ----- 200 mg
Almidón de maíz ----- 100 mg
Lactosa ----- 100 mg
Estearato de magnesio ----- cantidad óptima
La preparación del comprimido se realizó mezclando los componentes anteriores y conformando el comprimido.

Preparación de cápsula

- 60 KS534 ----- 100 mg
Lactosa ----- 50 mg
Almidón de maíz ----- 50 mg
Talco ----- 2 mg
Estearato de magnesio ----- cantidad óptima
La preparación del comprimido se realizó mezclando los componentes anteriores y rellenando una cápsula de gelatina según un método convencional de preparación de gelatina.

Preparación de líquido

65 KS534 ----- 1000 mg

Azúcar ----- 20 g

Polisacárido ----- 20 g

Aroma de limón ----- 20 g

La preparación líquida se preparó disolviendo el principio activo, e introduciendo posteriormente todos los componentes en un recipiente de 1000 ml y esterilización según un método convencional de preparación de líquido.

Preparación del alimento saludable

KS534 ----- 1000 mg

10 Mezcla de vitaminas ----- cantidad óptima

Acetato de vitamina A ----- 70 g

Vitamina E ----- 1,0 mg

Vitamina B₁₀ ----- 13 mg

Vitamina B₂ ----- 0,15 mg

15 Vitamina B₆ ----- 0,5 mg

Vitamina B₁ ----- 20,2 g

Vitamina C ----- 10 mg

Biotina ----- 10 g

Amida del ácido nicotínico ----- 1,7 mg

20 Ácido fólico ----- 50 g

Ácido pantoténico calcio ----- 0,5 mg

Mezcla de minerales ----- cantidad óptima

Sulfato ferroso ----- 1,75 mg

Óxido de cinc ----- 0,82 mg

25 Carbonato de magnesio ----- 25,3 mg

Fosfato monopotásico ----- 15 mg

Fosfato dicálcico ----- 55 mg

Citrato de potasio ----- 90 mg

Carbonato de calcio ----- 100 mg

30 Cloruro de magnesio ----- 24,8 mg

La vitamina y mezcla de minerales anteriormente mencionada se puede variar de muchas formas. No se considera que dichas variaciones se separen del espíritu y el alcance de la presente invención.

Preparación de la bebida saludable

35

KS534 ----- 1000 mg

Ácido cítrico ----- 1000 mg

Oligosacárido ----- 100 g

Concentración de albaricoque ----- 2 g

40 Taurina ----- 1 g

agua destilada ----- 900 ml

La preparación de la bebida saludable se realizó disolviendo el principio activo, mezclado, agitación a 85 °C durante 1 hora, se filtró y posteriormente todos los componentes se introdujeron en un recipiente de 1000 ml y se esterilizó por un método convencional de preparación de bebidas saludables.

45

Siendo la invención tal como se ha descrito, será evidente que la misma se puede variar de muchas formas. No se considera que dichas variaciones se separen del espíritu y el alcance de la presente invención, y se pretende que todas estas variaciones que serían evidentes para el experto en la técnica queden incluidas en el alcance de las presentes reivindicaciones.

50

Aplicabilidad industrial

Tal como se describe en la presente invención, el compuesto KS534 de la invención procedente del extracto de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum* mostró una potente actividad antiinflamatoria, antialérgica, antiasmática y anti-EPOC, confirmada por varios ensayos *in vitro*, por ejemplo, (1) ensayo citotóxico usando la línea de células HT1080, H292 y EL4, (2) un ensayo de inhibición de la expresión de MUC5AC (formación de moco oligomérico/gel) inducido por TNF-alfa, (3) ensayo indicador con luciferasa de NF-kappa B, (4) ensayo de inhibición sobre la actividad del factor de transcripción de NF-kappa B; (5) inhibición de la expresión del ARNm de genes diana tales como MMP-9, MUC5AC e IL-4 mediante la inhibición de la actividad de NF-kappa B; (6) efecto de inhibición dependiente de la dosis sobre la reproducción de MUC5AC en un ensayo de reproducción de la proteína MUC5AC; así como ensayos *in vivo*, por ejemplo, (7) efecto de reducir el número de células inflamatorias tales como eosinófilos usando un modelo de ratón sensibilizado/estimulado con OVA, (8) ensayo de inhibición sobre la liberación de IgE, citoquinas inflamatorias tales como IL-4, IL-5, IL-13 etc. en fluido BALF e invasión de células inflamadas, así como la supresión de la hipersensibilidad de las vías respiratorias e hiperplasia de las células de globo, (9) un ensayo de inhibición que utiliza un modelo animal de EPOC (ratón C57B/6N) sobre la proliferación de

55

60

65

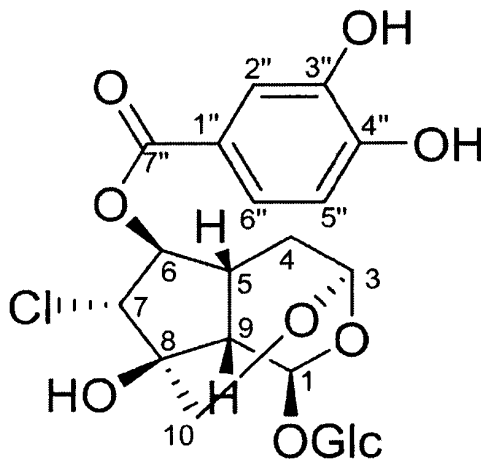
células inflamatorias en fluido BALF, la inhibición de la reproducción de ROS (especies reactivas de oxígeno), y la actividad de la elastasa de neutrófilos, el efecto de reducción del nivel de IL-6, TNF-alfa y las células inflamatorias infiltradas, etc. Por tanto, se puede usar como compuesto terapéutico o alimento funcional saludable para tratar y prevenir enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

5

REIVINDICACIONES

1. 3,4-Dihidroxibenzoato de (3R,5S,5aS,6R,7S,8R,8aS)-8-cloro-8a-hidroxi-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6 - (hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)-1H-3,6-metanociclopenta[e][1,3]dioxepin-7-il (KS534) representado por la
- 5 siguiente fórmula química (1), una sal farmacéuticamente aceptable o solvatos del mismo:

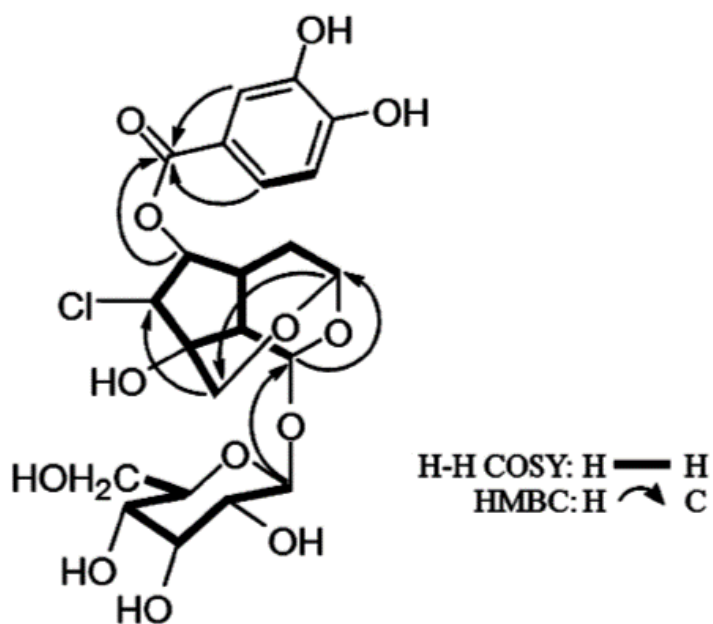
[Fórmula química 1]



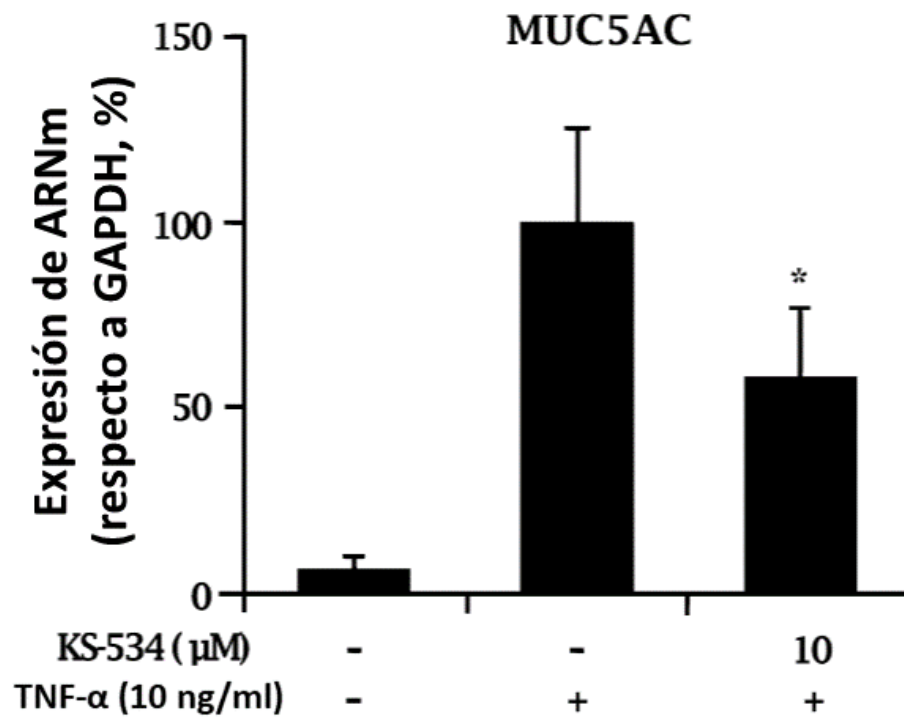
(1)

- 10 2. El compuesto de la reivindicación 1 (KS534), la sal farmacéuticamente aceptable o solvatos del mismo para su uso en un método de tratamiento o prevención de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en mamíferos, en el que el método comprende administrar una
- 15 cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto (KS534), dicha sal farmacéuticamente aceptable o solvatos del mismo al mamífero que padece enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).
- 20 3. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto KS534, la sal farmacéuticamente aceptable o solvatos del mismo tal como se define en la reivindicación 1 aislado de *Pseudolysimachion rotundum* var *subintegrum*, y que comprende además transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.
4. Una composición farmacéutica de la reivindicación 3 para su uso en un método de tratamiento o prevención de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).
- 25 5. Un alimento funcional saludable que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto (KS534), la sal farmacéuticamente aceptable o solvatos del mismo tal como se define en la reivindicación 1 como principio activo para la prevención o alivio de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

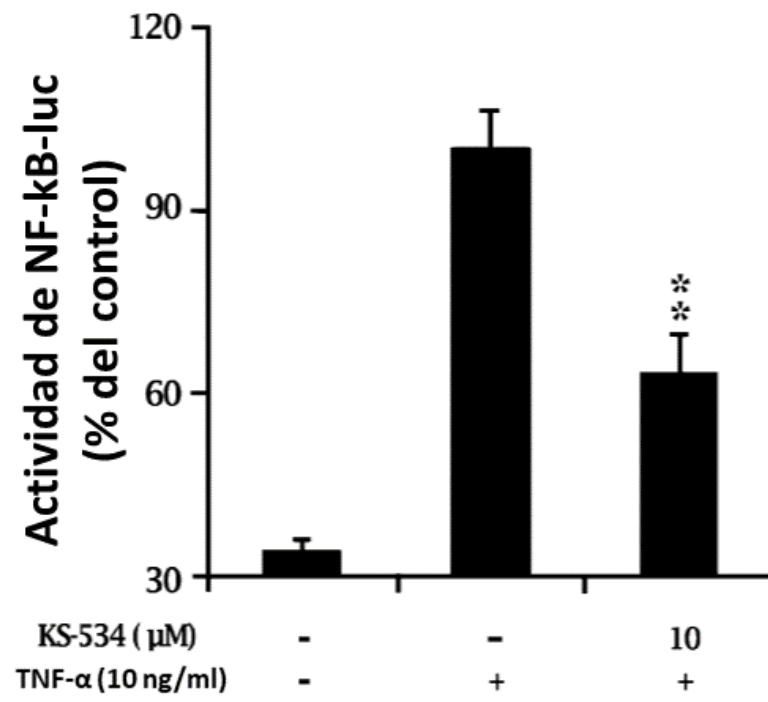
[Fig. 1]



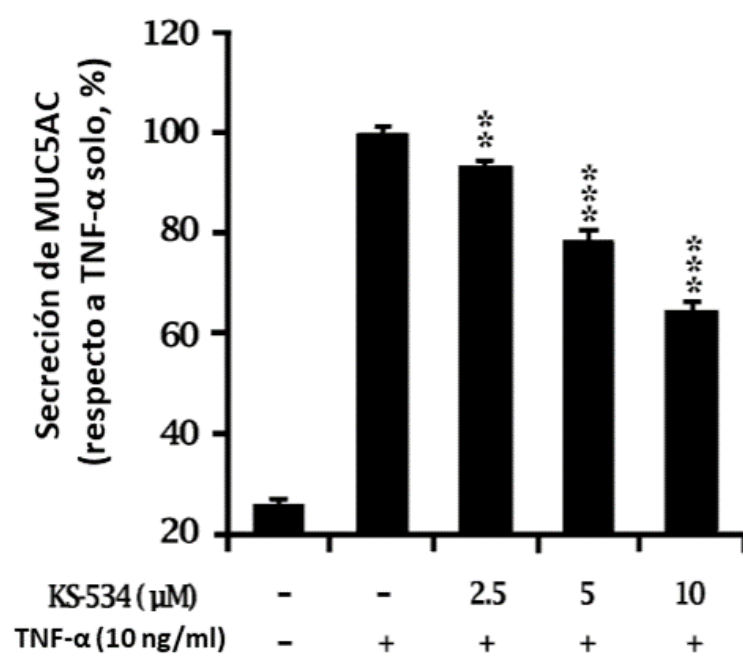
[Fig. 2]



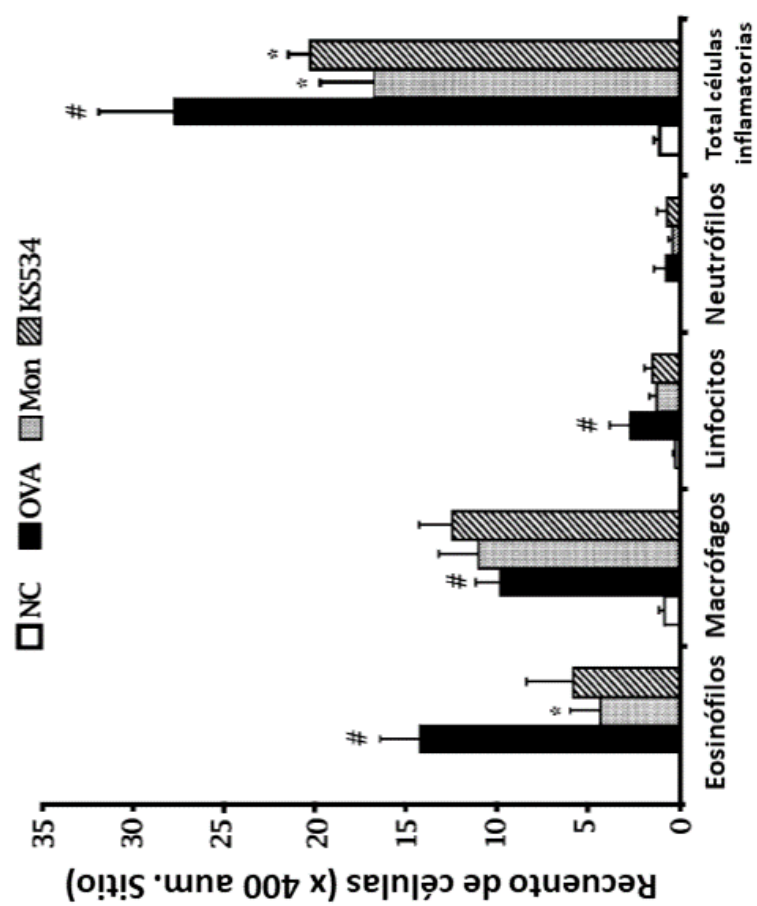
[Fig. 3]



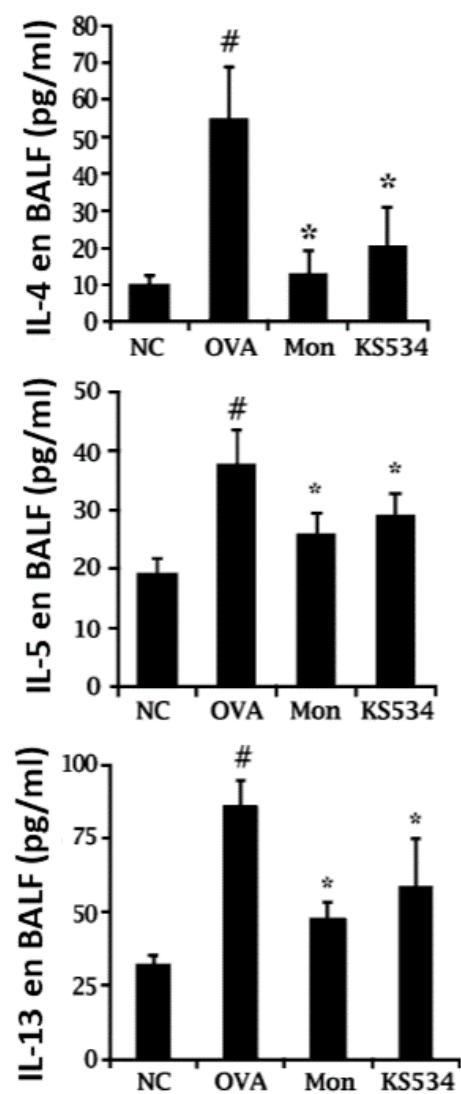
[Fig. 4]



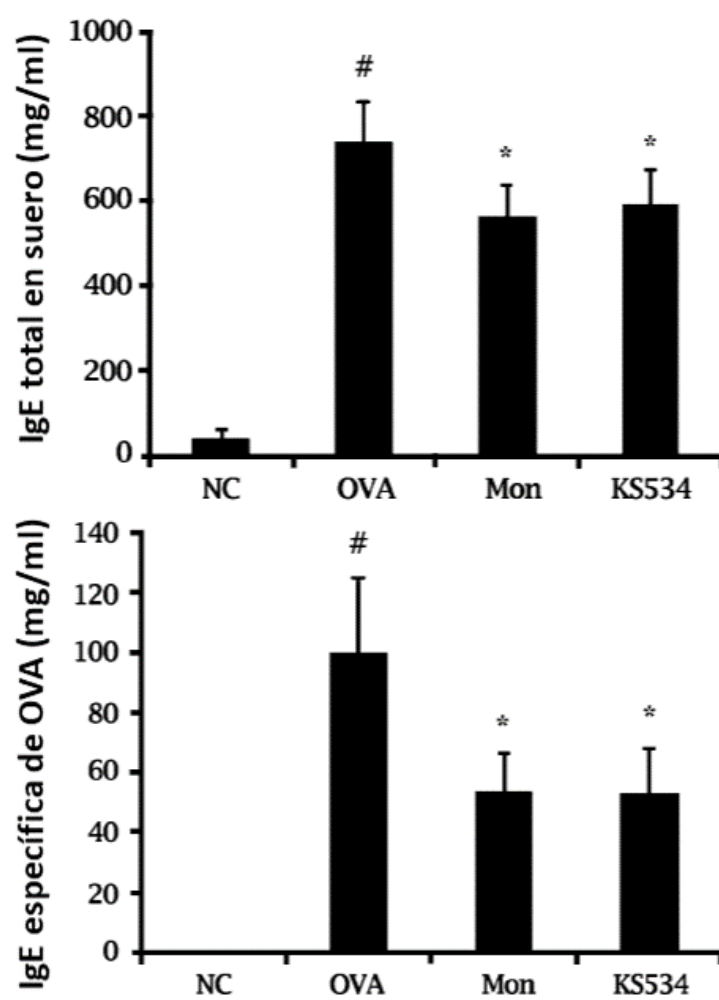
[Fig. 5]



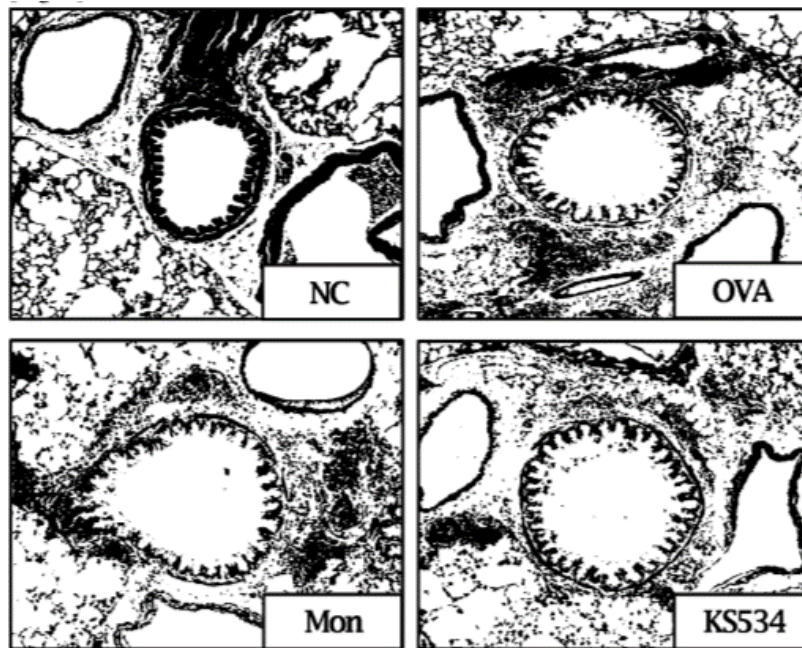
[Fig. 6]



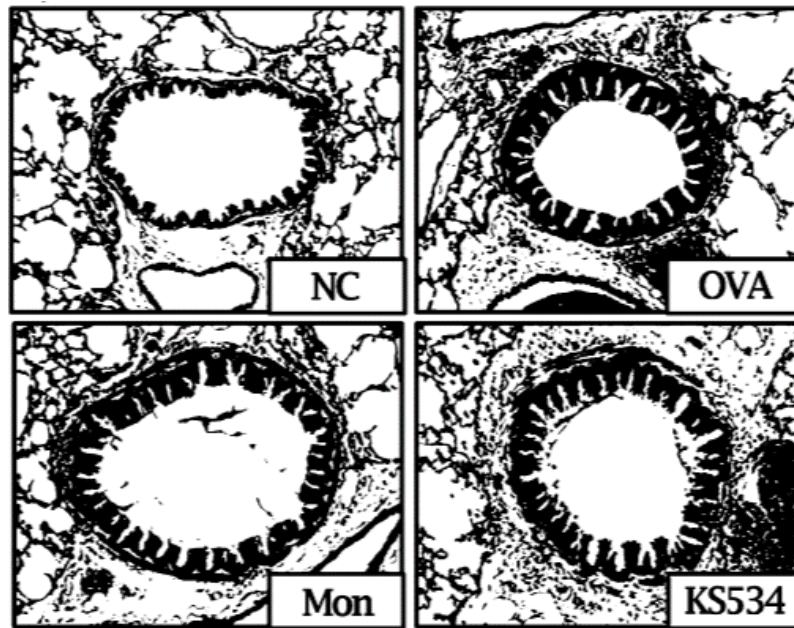
[Fig. 7]



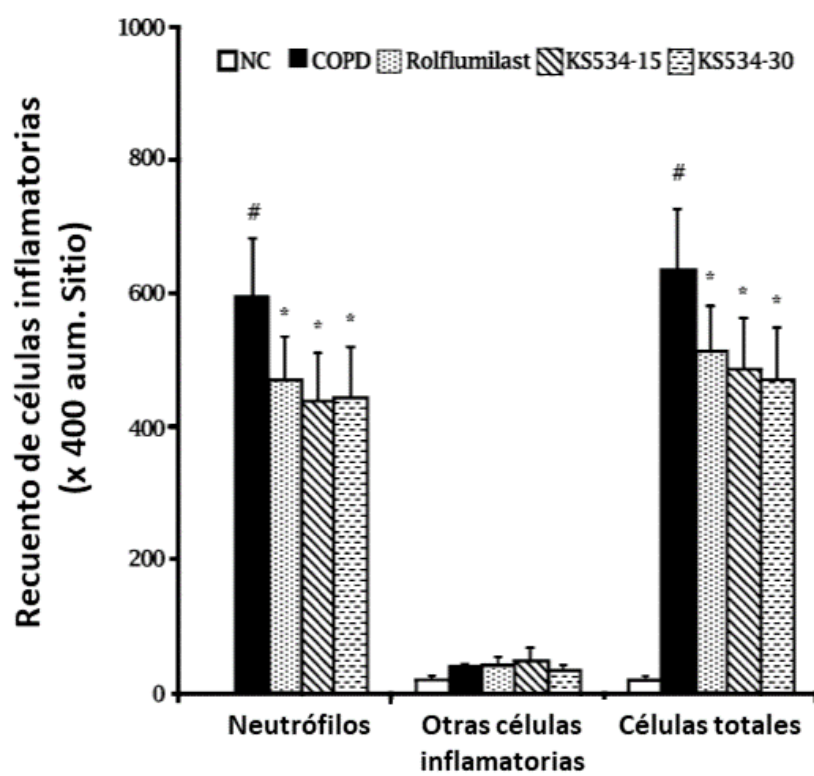
[Fig. 8]



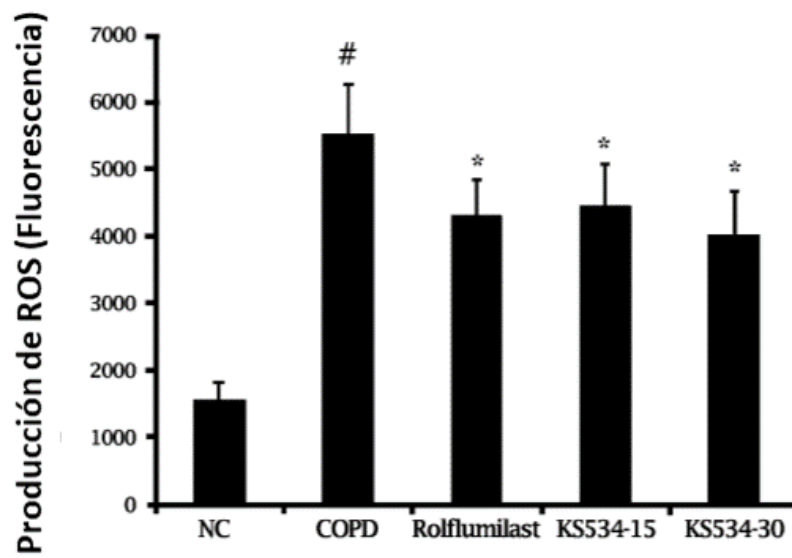
[Fig. 9]



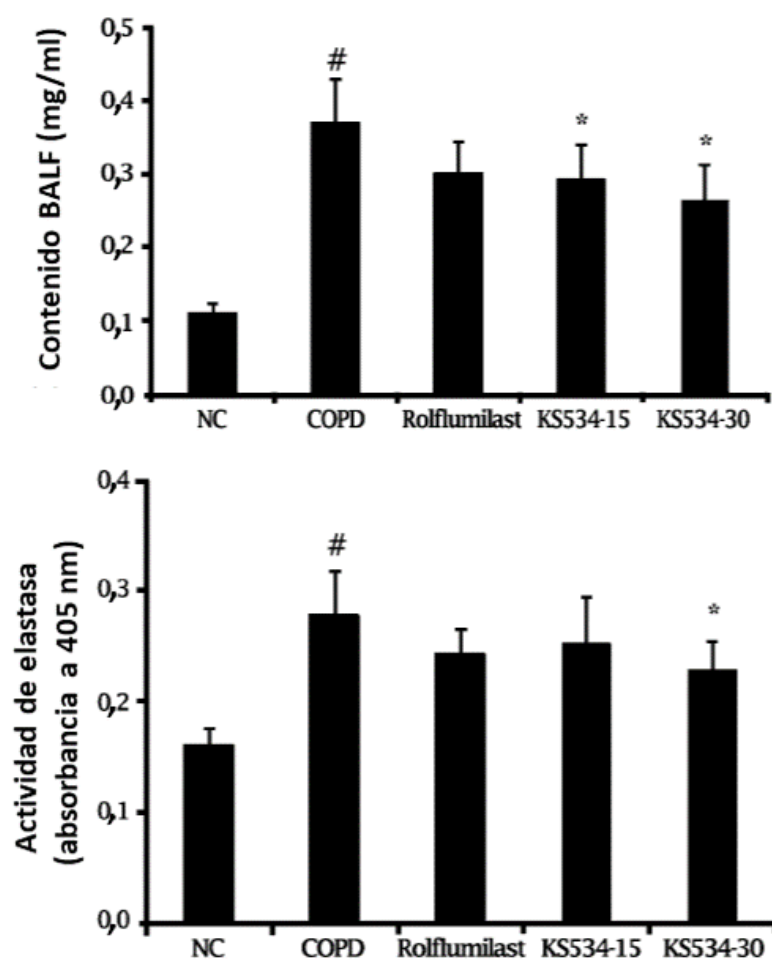
[Fig. 10]



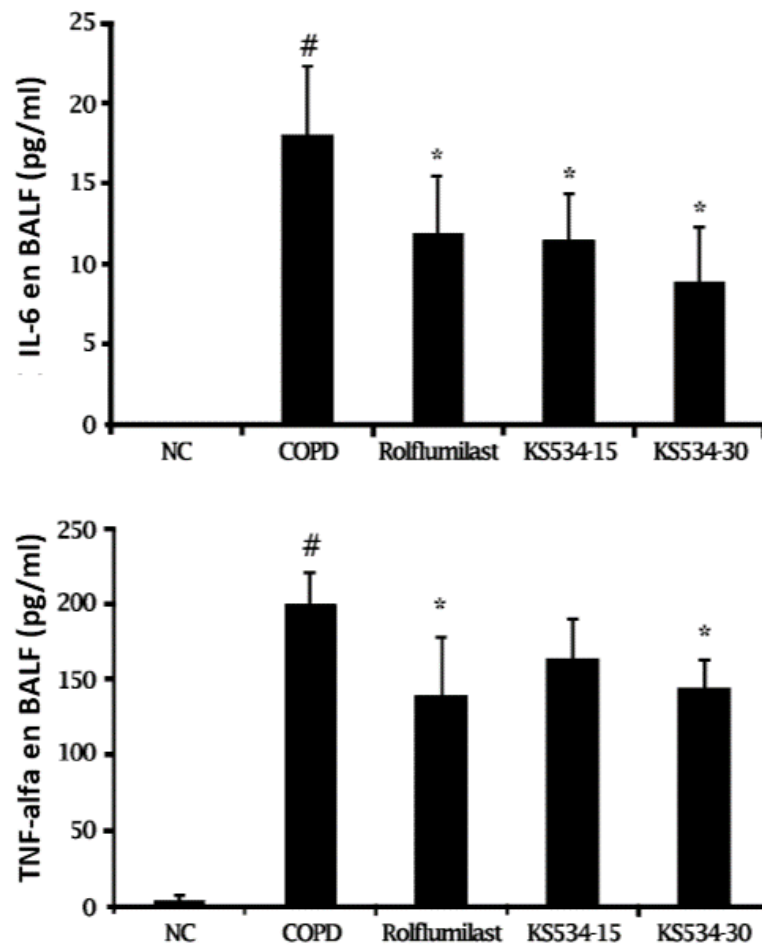
[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]



[Fig. 14]

