



IP
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0915077-3

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0915077-3

(22) Data do Depósito: 12/06/2009

(43) Data da Publicação do Pedido: 17/12/2009

(51) Classificação Internacional: A61K 36/718; A61K 36/25.

(30) Prioridade Unionista: KR 10-2009-0031344 de 10/04/2009; KR 10-2008-0055537 de 13/06/2008; KR 10-2008-0055538 de 13/06/2008.

(54) Título: COMPOSIÇÃO ANTITÚSSICA OU EXPECTORANTE PARA PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DE DOENÇA RESPIRATÓRIA E ALIMENTO FUNCIONAL PARA A SAÚDE

(73) Titular: AHN-GOOK PHARMACEUTICAL CO., LTD.. Endereço: 993-75, Daerim 2-dong, Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-072, CORÉIA DO SUL, REPÚBLICA DA CORÉIA(KR)

(72) Inventor: JIN AUH; CHANG-HWAN KIM; CHANG-KYUN HAN; SUNG-HUM YEON; YOUNG-JUNE SHIN; MIN-KI SHIN; SOO-IM CHANG.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 12/06/2009, observadas as condições legais

Expedida em: 13/11/2018

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

**“COMPOSIÇÃO ANTITÚSSICA OU EXPECTORANTE
PARA PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DE DOENÇA RESPIRATÓRIA
E ALIMENTO FUNCIONAL PARA A SAÚDE”
RELATÓRIO DESCRITIVO**

Campo da Invenção

[001] É proporcionado um extrato do rizoma de *Coptidis* ou um extrato combinado do rizoma de *Coptidis* com folha de hera que é útil como expectorante, antitússico e/ou atividades anti-histamínicas. Em particular, uma composição antitússica e/ou expectorante e/ou uma composição para prevenir e tratar doenças respiratórias compreendendo o extrato do rizoma de *Coptidis* ou o extrato combinado do rizoma de *Coptidis* com folha de hera como ingrediente ativo e um método de preparar o mesmo.

Antecedentes da Invenção

[002] A tosse e o escarro são conhecidos serem causados por fatores físicos ou químicos, tais como o ar frio, substâncias estranhas incluindo microorganismos patológicos, contaminantes do ar, alérgenos e semelhantes e podem ser divididos de acordo com as causas como se segue:

[003] Primeiro, se receptores de tosse, na laringe, traquéia, brônquios, faringe, seios paranasais, diafragma e semelhantes, são estimulados por fatores psicoquímicos, a estimulação é liberada para o centro da tosse na medula do cérebro, por meio do que ocorre o reflexo da tosse.

[004] Segundo, se o sistema nervoso parassimpático for ativado por fatores físicos ou químicos, um músculo liso dos brônquios é constrito, por meio do que podem ocorrer os sintomas tais como con-

vulsão brônquica e bronco-constricção.

[005] Terceiro, mediadores inflamatórios e semelhantes são liberados a partir de células masto por fatores físicos ou químicos.

[006] Portanto, a remoção dos fatores acima pode suprimir a tosse e o escarro. Todavia, a maior parte de drogas desenvolvidas até agora são principalmente produtos químicos sintéticos e, deste modo, ocasionam vários efeitos colaterais. As drogas naturais desenvolvidas para compensar esses defeitos não conseguem exibir efeito excelente para suprimir a tosse e escarro.

[007] Entretanto, a asma, que é uma doença respiratória representativa, mostra repetida e espasmodicamente sintomas tais como respiração difícil, tosse, respiração estridulosa e semelhantes. A asma pode ser dividida em asma cardíaca e asma brônquica. Embora taxa de incidência da asma seja variada de acordo com o país, a raça humana, a idade e semelhantes, foi reportado na Inglaterra em 2007 que mais ou menos 7,9% de adultos, 13,7% de crianças e 9,4% de adultos mais velhos sofrem de asma. Na Coréia, a incidência foi aumentada devido a mudança no estilo de vida, na poluição ambiental, no aumento de estresse e semelhantes. Recentemente, a severidade da asma foi maximizada, uma vez que a poluição ambiental se torna séria, a idade de incidência de asma se torna mais baixa e os sintomas duram mais tempo.

[008] A obstrução respiratória, que é característica para a asma, acontece segundo 3 etapas. Especificamente, um músculo liso dos brônquios é constrito, a mucosa pulmonar fica espessada e o muco pegajoso se acumula nos brônquios e bronquíolos, ficando, desse modo a área respiratória obstruída. Entre estas etapas, apenas a constrição do músculo liso dos brônquios pode ser facilmente recuperada.

[009] No mecanismo de ocorrência da asma exógena (alergênica),

o IgE é especialmente importante e o IgG relaciona-se com ela em parte. O IgE libera mediadores, tais como a histamina, SRS-A, ECF-A, NCF, PAF, Kinin, PGs e semelhantes, que ativam as células de masto para ocasionar reação de hipersensibilidade. A asma endogênica (não alérgica), embora o seu mecanismo não tenha sido esclarecido, parece ser mediado pelo nervo autonômico. A estimulação da colina em pacientes endogênicos causa o isolamento de um mediador como a histamina a partir de uma célula masto diretamente através de órgãos terminais, aumento na secreção de células em taça, expansão do vaso sanguíneo pulmonar e constrição da traquéia, brônquios e bronquíolos, aumentando, assim, a convulsão brônquica e a secreção de muco.

[0010] O tratamento fundamental da asma não foi ainda desenvolvido e são desenvolvidos vários métodos e drogas para prevenir um espasmo e complicações; porém, eles simplesmente melhoram os sintomas e fundamentalmente não conseguem tratar a doença e podem causar sérios efeitos colaterais.

[0011] A fim de superar esses limites das drogas existentes, há uma demanda pelo desenvolvimento de drogas inovativas capazes de tratar fundamentalmente a causa e melhorar efetivamente os sintomas de doença. Todavia, vários leucócitos e citocinas e mediadores inflamatórios separados a partir deles estão envolvidos na doença respiratória e, deste modo, o tratamento efetivo é difícil com um composto de um componente único. Portanto, um extrato natural tendo vários ingredientes e mecanismos podem ser uma droga efetiva e, deste modo, existe uma demanda pelo desenvolvimento de uma droga com base no extrato natural.

Descrição Detalhada da Invenção

Problema Técnico

[0012] Como resultados de estudos para o desenvolvimento de

anti-tússicos ou expectorantes, os presentes inventores identificaram que o extrato do rizoma de Coptidis ou extrato combinado do rizoma de Coptidis com folha de hera tem excelentes atividades antitússicas, expectorantes e anti-histamínicas, para completar a presente invenção.

[0013] Uma modalidade proporciona um uso inovativo do extrato do rizoma de Coptidis ou extrato combinado do rizoma de Coptidis com folha de hera para remoção de escarro, supressão da tosse e/ou tratamento e/ou prevenção de doenças respiratórias.

[0014] Outra modalidade proporciona uma composição antitússica ou expectorante e/ou uma composição para prevenir e/ou tratar doenças respiratórias, compreendendo o extrato do rizoma de Coptidis ou extrato combinado do rizoma de Coptidis com folha de hera como ingrediente ativo e um método para a preparação do mesmo.

[0015] Ainda outra modalidade proporciona um método para suprimir a tosse, remover o escarro e/ou tratar e/ou impedir doenças respiratórias, compreendendo a etapa de administrar uma composição que compreende o extrato do rizoma de Coptidis ou extrato combinado do rizoma de Coptidis com folha de hera como ingrediente ativo para um paciente necessitado da supressão da tosse, remoção do escarro e/ou tratamento e/ou prevenção de doença respiratória.

Solução Técnica

[0016] Uma modalidade relaciona-se com um uso inovativo do extrato do rizoma de Coptidis ou extrato combinado do rizoma de Coptidis com folha de hera para remover escarro, suprimir a tosse e/ou tratar e/ou prevenir doenças respiratórias.

[0017] Outra modalidade relaciona-se com uma composição antitússico ou expectorante e/ou uma composição para prevenir e/ou tratar doenças respiratórias, compreendendo o extrato do rizoma de Coptidis ou extrato combinado do rizoma de Coptidis com folha de hera

como ingrediente ativo.

[0018] O *Coptidis Rhizoma* é uma erva perene que pertence à família das *Ranunculaceae* e a sua parte de rizoma é principalmente usada. É conhecido que contém o alcalóide berberina, palmatina, coptisina, berberastina, magnoflorina e semelhantes, como componentes farmacológicos principais.

[0019] Contudo, o efeito do extrato de *Coptidis Rhizoma* e uma composição contendo *Coptidis Rhizoma* sobre as atividades antitússica, expectorante e anti-histamínico não foi ainda estudada.

[0020] Os presentes inventores apuraram que o extrato de *Coptidis Rhizoma* tem atividades antitússicas, expectorantes e anti-histamínicas e é efetivo no tratamento e/ou prevenção da doença respiratória para completar a presente invenção.

[0021] A hera pertence à família das *Araliaceae* e significa uma planta que pertence ao gênero *Hedera* (*Hedera* spp.). Por exemplo, pode incluir, mas, sem limitação, *Hedera algeriensis*, *Hedera azorica*, *Hedera canariensis*, *Hedera colchica*, *Hedera helix*, *Hedera hibernica*, *Hedera maderensis*, *Hedera nepalensis*, *Hedera pastuchowii*, *Hedera rhombea* e semelhantes. Os efeitos antitússicos e expectorantes do extrato seco de folha de hera foram revelados; porém, não foi reportado ainda que, quando o extrato de folha de hera for administrado combinado com outros extratos herbários, um efeito sinérgico significativo pode ser obtido sem efeitos colaterais.

[0022] Os presentes inventores identificaram que a combinação do extrato de *Coptidis Rhizoma* e extrato de folha de hera aumenta notavelmente o efeito antitússico, o efeito expectorante, o efeito anti-histamínico, o efeito de supressão da bronco-constricção, o efeito de supressão da hipersensibilidade das vias aéreas, o efeito de supressão da oclusão brônquica no tecido pulmonar e o efeito de supressão da

infiltração da célula inflamatória, comparada a cada extrato sozinho. Além disso, na presente invenção, é sugerida a relação de mistura ótima do extrato de *Coptidis Rhizoma* e extrato de folha de hera que mostra o efeito sinérgico máximo para as atividades farmacológicas.

[0023] A fim de maximizar os efeitos sinérgicos para as atividades de supressão antitússica, expectorante, anti-histamínica, da bronco-constricção, de supressão da hipersensibilidade das vias aéreas, de supressão da oclusão brônquica no tecido pulmonar e de supressão da infiltração da célula inflamatória por mistura do extrato de *Coptidis Rhizoma* com o extrato da folha da hera, a relação de mistura do extrato de folha de hera e do extrato de *Coptidis Rhizoma* é de 0,1 :1 a 10: 1, com base no peso de conteúdo sólido (peso do extrato de folha de hera: peso de extrato de *Coptidis Rhizoma*), de preferência de 0,2:1 a 5:1, com maior preferência de 1 :1 a 4:1, com muito maior preferência de 1,5:1 a 3,5:1, com maior preferência de 2,5:1 a 3,5:1. O termo de 'conteúdo sólido' significa aqueles a partir dos quais um solvente usado para preparar o extrato é removido.

[0024] O termo 'extrato' significa aqui um extrato cru de *Coptidis Rhizoma* e/ou folha de hera e/ou um extrato específico solvente – soluto ou fração solúvel do extrato cru e pode estar na forma de uma solução, concentração ou pó. O termo 'extrato combinado de *Coptidis Rhizoma* com folha de hera' significa tanto uma mistura de extrato de folha de hera e extrato de *Coptidis Rhizoma* respectivamente obtidos extraíndo folha de hera e *Coptidis Rhizoma* e um extrato obtido extraíndo uma mistura de folha de hera e *Coptidis Rhizoma*.

[0025] O extrato de *Coptidis Rhizoma* pode ser um extrato cru obtido extraíndo *Coptidis Rhizoma*, de preferência a parte do rizoma da mesma com um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste em água e álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 4 carbonos ou um extrato de solvente-soluto obtido adicionando um ou mais

solventes selecionados a partir do grupo que consiste numa solução aquosa de álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 6 carbonos, de preferência solução aquosa de álcool propílico, solução aquosa de álcool isopropílico e álcool butílico saturado de água para o extrato cru.

[0026] O extrato de folha de hera pode ser um extrato cru obtido extraíndo folha de hera seca com um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste em água e álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 4 carbonos ou um extrato de solvente-soluto obtido adicionando um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste numa solução aquosa de álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 6 carbonos, de preferência solução aquosa de álcool propílico, solução aquosa de álcool isopropílico e álcool butílico saturado de água ao extrato cru. A hera usada para preparar o extrato de folha de hera pode ser *Hedera spp.* e, por exemplo, pode ser uma ou mais selecionada a partir do grupo que consiste em *Hedera algeriensis*, *Hedera azorica*, *Hedera canariensis*, *Hedera colchica*, *Hedera helix*, *Hedera hibernica*, *Hedera maderensis*, *Hedera nepalensis*, *Hedera pastuchowii*, *Hedera rhombea* e semelhantes, mas sem limitação a elas.

[0027] Numa modalidade preferível, o solvente usado para preparar o extrato cru de *Coptidis Rhizoma* ou folha de hera pode ser um ou mais selecionado a partir do grupo que consiste em água, de 10 a 70% (v/v), de preferência de 20 a 60% (v/v), com maior preferência de 25 a 55% (v/v) de álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 4 carbonos, de preferência solução aquosa de metanol e solução aquosa de etanol e álcool butílico saturado em água.

[0028] O solvente usado para preparar o extrato de solvente-soluto de *Coptidis Rhizoma* ou folha de hera pode ser um ou mais selecionado a partir do grupo que consiste em 10 a 70% (v/v), de preferência de 20 a 60% (v/v), com maior preferência de 25 a 55% (v/v) de álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 6 carbonos, de preferência solução aquosa de

álcool propílico e solução aquosa de álcool propílico e álcool butílico saturado em água.

[0029] O extrato combinado de *Coptidis Rhizoma* com folha de hera pode ser uma mistura de extrato de *Coptidis Rhizoma* e extrato de folha de hera ou um extrato de uma mistura de *Coptidis Rhizoma* e folha de hera. Por exemplo, o extrato combinado pode ser um extrato cru obtido misturando *Coptidis Rhizoma* e folha de hera e extraíndo a mistura com um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste em água e álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 4 carbonos ou um extrato de solvente-soluto obtido adicionando um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste numa solução aquosa de álcool inferior tendo de 1 a 6 carbonos, de preferência solução aquosa de álcool propílico e solução aquosa de álcool propílico e álcool butílico saturado em água ao extrato cru. De preferência, o solvente usado para preparar o extrato cru de *Coptidis Rhizoma* e folha de hera pode ser água, de 10 a 70% (v/v), de preferência de 20 a 60% (v/v), com maior preferência cerca de 25 a 55% (v/v) de solução aquosa de metanol ou solução aquosa de etanol ou álcool butílico saturado em água. O solvente usado para preparar o extrato de solvente-soluto pode ser um ou mais selecionado a partir do grupo que consiste em 10 a 70% (v/v), de preferência de 20 a 60% (v/v), com maior preferência cerca de 25 a 55% (v/v) de uma solução aquosa de álcool inferior tendo de 1 a 6 carbonos, de preferência uma solução aquosa de álcool propílico e uma solução aquosa de álcool isopropílico e álcool butílico saturado em água.

[0030] A 'fração' pode ser obtida sujeitando o extrato de solvente-soluto a uma cromatografia em coluna de gel de sílica com um solvente misturado de cloreto de metileno e metanol (de 30:1 a 7:1 (v/v)).

[0031] O extrato de *Coptidis Rhizoma*, o extrato ou fração de solvente-soluto compreende berberina, palmatina, coptisina, columba-

mina e jatrorrizina, de preferência berberina (de 0,5 a 47,0 partes em peso) :palmatina (de 0,2 a 21,4 partes em peso): coptisina (de 0,1 a 18,0 partes em peso): columbamina (de 0,1 a 3,2 partes em peso) :jatrorrizina (de 0,1 a 2,6 partes em peso).

[0032] Em outro aspecto, a presente invenção relaciona-se com um método de preparar um extrato combinado de *Coptidis Rhizoma* com folha de hera tendo atividades antitússicas, expectorantes, anti-histamínicas, de supressão da bronco-constricção, de supressão da hipersensibilidade das vias aéreas, de supressão da oclusão brônquica no tecido pulmonar e de supressão da infiltração da célula inflamatória.

[0033] O método compreende a etapa de extrair *Coptidis Rhizoma*, de preferência a parte do rizoma do mesmo com um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste em água e álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 4 carbonos, por exemplo, água, de 10 a 70% (v/v), de preferência de 20 a 60% (v/v), com maior preferência, cerca de 25 a 55% (v/v) de solução aquosa de metanol ou solução aquosa de etanol ou álcool butílico saturado em água.

[0034] O método de preparar o extrato combinado de *Coptidis Rhizoma* com folha de hera pode compreender as etapas:

[0035] extrair folha de hera seca com um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste em água e álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 4 carbonos, por exemplo, água, de 10 a 70% (v/v), de preferência de 20 a 60% (v/v), com maior preferência de 25 a 55% (v/v) de solução aquosa de metanol ou solução aquosa de etanol, ou álcool butílico saturado em água para obter extrato de folha de hera;

[0036] extrair *Coptidis Rhizoma*, de preferência a parte do rizoma da mesma com um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste em água e álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 4 carbonos, por exemplo, água, de 10 a 70% (v/v), de preferência de 20 a

60% (v/v), com maior preferência de 25 a 55% (v/v) de solução aquosa de metanol ou solução aquosa de etanol ou álcool butílico saturado em água para obter extrato de *Coptidis Rhizoma*; e

[0037] misturar o extrato de folha de hera obtido e o extrato de *Coptidis Rhizoma* numa relação de 0,1:1 a 10:1 (peso do extrato de folha de hera: peso de extrato de *Coptidis Rhizoma*), de preferência de 0,2:1 a 5:1, com maior preferência de 1:1 a 4:1, com muito maior preferência de 1,5:1 a 3,5:1, com maior preferência de 2,5:1 a 3,5:1, com base no conteúdo sólido.

[0038] A etapa de preparar extrato de folha de hera e a etapa de preparar *Coptidis Rhizoma* extrai pode compreender, além disso, a etapa de adicionar um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste em álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 6 carbonos, de preferência álcool butílico saturado em água, álcool propílico e álcool isopropílico ao extrato obtido, obter um extrato de solvente-soluto.

[0039] A etapa de preparar o extrato de folha de hera será explicada em detalhe: a folha de hera é cortada e lavada com água para remover impurezas e a folha é secada e, então, extraída por refluxo com um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste em água e álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 4 carbonos, por exemplo, água, de 10 a 70% (v/v), de preferência de 20 a 60% (v/v), com maior preferência de 25 a 55% de solução aquosa de metanol ou solução aquosa de etanol ou álcool butílico saturado em água em uma quantidade de cerca de 5 a 20 vezes em volume, de preferência de 7 a 15 vezes em volume da folha de hera secada. A temperatura de extração é de 40 a 110°C, de preferência de 55 a 90°C.

[0040] Depois da extração, o extrato é filtrado para coletar o filtrado e o resíduo é extraído por refluxo com um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste em água e álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 4 carbonos, por exemplo, água, de 10 a 70%

(v/v), de preferência de 20 a 60% (v/v), com maior preferência de 25 a 55% de solução aquosa de metanol ou solução aquosa de etanol ou álcool butílico saturado em água numa quantidade de cerca de 5 a 15 vezes em volume, de preferência de 8 a 12 vezes em volume. A temperatura de extração é, embora não especificamente limitada, de 40 a 110°C, de preferência de 55 a 90°C. Depois da extração, o extrato é filtrado, o filtrado é combinado com filtrado previamente obtido e eles são concentrados sob vácuo para preparar extrato de folha de hera. As extrações em duas vezes e a combinação dos filtrados obtidos depois de cada extração podem aumentar a eficiência da extração, mas o número de extração não é limitado a isso.

[0041] A etapa de preparar o extrato do rizoma de *Coptidis* será explicada em detalhe: A parte de rizoma do *Coptidis Rhizoma* é cortada em pedaços pequenos e, então, um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste em água e álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 4 carbonos, por exemplo, água, de 10 a 70% (v/v), de preferência de 20 a 60% (v/v), com maior preferência de 25 a 55% de solução aquosa de metanol ou solução aquosa de etanol ou álcool butílico saturado em água é adicionado a ela numa quantidade de cerca de 3 a 20 vezes em volume, de preferência de 5 a 15 vezes em volume do extrato de matéria-prima durante 0,5 a 20 horas, de preferência de 1 a 10 horas, com maior preferência de 2 a 5 horas. A temperatura de extração é, embora não especificamente limitada, de preferência de 40 a 110°C, de preferência de 55 a 90°C. De preferência, o extrato obtido é filtrado para coletar o filtrado e um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste em água e álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 4 carbonos, por exemplo, água, de 10 a 70% (v/v), de preferência de 20 a 60% (v/v), com maior preferência de 25 a 55% de solução aquosa de metanol ou solução aquosa de etanol ou álcool butílico saturado em água, é adicionado ao resíduo numa quantidade de cerca de 5 a 15 vezes em volume, de preferência de 8 a 12 vezes em

volume e a temperatura é elevada para re-extrair durante de 1 a 10 horas, de preferência de 2 a 5 horas e, então, o extrato é filtrado e concentrado sob vácuo para obter o extrato do rizoma de *Coptidis*. A combinação do extrato obtido com o filtrado previamente obtido pode aumentar a eficiência de extração.

[0042] As extrações em duas vezes e a combinação dos filtrados obtidos depois de cada extração pode aumentar a eficiência de extração, mas o número de extrações não é limitado a isso.

[0043] Se a quantidade do solvente usado para preparar o extrato do rizoma de *Coptidis* e/ou o extrato da folha de hera for muito pequena, a agitação é difícil e a solubilidade do extrato diminui para eficiência de extração mais baixa. Se a quantidade do solvente usado para preparar o extrato do rizoma de *Coptidis* e/ou o extrato da folha de hera for demais, a quantidade de álcool inferior usado para a próxima etapa de purificação fica aumentada de modo a causar problemas econômicos e problemas na manipulação. Deste modo, é preferível ajustar a quantidade do solvente dentro da faixa acima descrita.

[0044] De acordo com uma modalidade preferida da presente invenção, a re-extração pode ser feita depois da extração primária, que é para prevenir a diminuição na eficiência de extração realizando apenas a extração primária, porque no caso do extrato de erva é produzido em grande quantidade, ainda que seja feita a filtração efetiva, a quantidade de extrato de erva é elevada, gerando, assim, perdas altas da mesma e deste modo, a eficiência de extração torna-se diminuída, quando for realizada apenas a extração primária. Portanto, de acordo com uma modalidade preferida da presente invenção, a re-extração pode ser feita depois da extração primária. Além disso, como resultado de examinar a eficiência de extração em cada etapa, foi apurado que mais ou menos de 80 a 90% da quantidade de extrato total é extraída por extração secundária e, deste modo, pode ser sugerido que extrações

de duas etapas permitam eficácia econômica significativa em comparação com extrações de etapas múltiplas de mais da terceira extração.

[0045] O extrato de solvente-soluto pode ser preparado suspendendo o extrato cru obtido em aproximadamente de 2 a 10 vezes, de preferência cerca de 3 a 7 vezes em volume da água e adicionando a ele um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste numa solução aquosa de álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 6 carbonos, de preferência solução aquosa de álcool propílico ou solução aquosa de álcool isopropílico e álcool butílico saturado em água numa quantidade de 0,5 a 3 vezes, de preferência quantidade equivalente a 2 vezes da suspensão por uma vez a cinco vezes, de preferência duas vezes a três vezes extrair uma camada de solvente-soluto e, então, concentrar sob vácuo.

[0046] A etapa de extração de solvente-soluto usando álcool inferior é para purificar impurezas desnecessárias tais como proteínas, polissacarídeos, ácidos graxos e semelhantes. Se a quantidade do álcool inferior usado para isso for pequena comparada com o filtrado, forma de partículas finas de ingredientes desnecessários tais como ácido graxo, fazendo, assim, a separação não suave de camada e diminuindo a quantidade de extração de ingredientes ativos. Portanto, pode ser preferível ajustar a quantidade do álcool inferior dentro da faixa acima descrita.

[0047] A fração de álcool inferior obtida depois da separação de camada é concentrada sob vácuo a 50 a 60°C para remover o solvente restante na amostra.

[0048] A fim de controlar o conteúdo do álcool inferior restante no concentrado obtido de forma a torná-lo apropriado para uso como matéria-prima para medicina, o concentrado pode ser sujeito a concentração azeotrópica com mais ou menos de 10 a 30 vezes, de preferência de 15 a 25 vezes, com maior preferência aproximadamente 20 vezes por

peso de água, com base na quantidade total do concentrado, por 1 a 5 vezes, de preferência de 2 a 3 vezes e quantidade equivalente de água é adicionada a ela para suspendê-la homogeneamente e, então, a suspensão é liofilizada para preparar o extrato de *Coptidis Rhizoma* e/ou extrato de folha de hera na forma de pó.

[0049] De preferência, a fim de combinar homogeneamente cada extrato no extrato combinado, mais ou menos 2 a 3 vezes em peso da água são adicionados ao extrato combinado e, então, é concentrado sob vácuo a 50 a 60°C, uma quantidade equivalente de água é adicionada novamente ao concentrado para suspendê-lo homogeneamente e, então, a suspensão é liofilizada para preparar uma composição na forma de pó.

[0050] De acordo com outra modalidade, o método para preparar o extrato combinado de *Coptidis Rhizoma* com folha de hera pode compreender as etapas de:

[0051] misturar folha de hera seca e *Coptidis Rhizoma*, de preferência a parte do rizoma da mesma numa relação de peso de 1 :4 a 7:1 (peso de folha de hera: peso de *Coptidis Rhizoma*), de preferência de 1:1 a 6:1, com maior preferência de 2:1 a 5:1 para preparar uma mistura de folha de hera e *Coptidis Rhizoma*; e

[0052] extrair a mistura com um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste em água e álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 4 carbonos, por exemplo, água, de 10 a 70% (v/v), de preferência de 20 a 60% (v/v), com maior preferência mais ou menos 25 a 55% (v/v) de solução aquosa de metanol ou solução aquosa de etanol ou álcool butílico saturado em água.

[0053] O método acima pode compreender, além disso, a etapa de adicionar um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste em álcool inferior linear ou ramificado tendo de 1 a 6 carbonos,

de preferência álcool propílico, álcool isopropílico e álcool butílico saturado em água, para obter extrato de solvente-soluto, depois da etapa de obter o extrato da mistura de folha de hera e Coptidis Rhizoma. Os detalhes das etapas de preparar o extrato cru e o extrato de solvente-soluto são conforme descritos na preparação de cada extrato de erva.

[0054] Como o método de extração usado na presente invenção, pode ser usado qualquer método convencionalmente usado. Por exemplos, a extração pode ser realizada através de extração à temperatura ambiente, extração por água quente, extração ultrassônica, extração com refluxo ou extração com arrefecimento, mas não limitado a isso.

[0055] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona uma composição antitússica que compreende o extrato de Coptidis Rhizoma ou um extrato combinado de Coptidis Rhizoma com folha de hera como ingrediente ativo. Em outro aspecto, a presente invenção proporciona também uma composição expectorante que compreende o extrato de Coptidis Rhizoma ou um extrato combinado de Coptidis Rhizoma com folha de hera como ingrediente ativo. Ainda noutro aspecto, a presente invenção proporciona também uma composição para prevenir e/ou tratar a doença respiratória compreendendo o extrato de Coptidis Rhizoma ou um extrato combinado de Coptidis Rhizoma com folha de hera como ingrediente ativo.

[0056] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um método de suprimir a tosse compreendendo a etapa de administrar o extrato de Coptidis Rhizoma ou um extrato combinado de Coptidis Rhizoma com folha de hera a um paciente numa quantidade terapeuticamente efetiva. Em outro aspecto, a presente invenção também proporciona um método de remover o escarro compreendendo a etapa de administrar o extrato de Coptidis Rhizoma ou um extrato combinado de Coptidis Rhizoma com folha de hera a um paciente numa quantidade

terapeuticamente efetiva. Ainda noutro aspecto, a presente invenção proporciona também um método de prevenir e/ou tratar a doença respiratória compreendendo a etapa de administrar o extrato de *Coptidis Rhizoma* ou um extrato combinado de *Coptidis Rhizoma* com folha de hera a um paciente numa quantidade terapêuticamente efetiva. O paciente pode ser qualquer mamífero necessitado de supressão da tosse, remoção do escarro ou tratamento e/ou prevenção da doença respiratória, de preferência, humano.

[0057] A quantidade terapêuticamente efetiva é uma dosagem determinada para obter o efeito de tratamento desejado. Pode ser variado dependendo da idade, do peso, da distinção de sexo, da forma de dosagem, da condição de saúde e da severidade da doença e pode também ser variado dependendo do julgamento do médico ou farmacêutico. Por exemplo, a dosagem por dia pode ser de 0,5 a 500 mg/kg, de preferência de 1 a 300 mg/kg, com base no conteúdo de ingrediente ativo, mas não limitado a isso. A dosagem pode ser administrada uma vez por dia ou várias vezes ao dia. A dosagem ilustra para caso médio e pode ser mais alta ou mais baixa individualmente. Se a dosagem por dia da composição que compreende o extrato combinado da presente invenção for menor do que a faixa acima descrita, não pode ser obtido efeito significativo; e, se exceder a faixa acima descrita, a eficiência econômica falha e a dosagem está fora da dosagem comum, ocasionando, deste modo, efeito colateral indesejável. Desta forma, a dosagem por dia está de preferência na faixa acima descrita.

[0058] O extrato de *Coptidis Rhizoma* e um extrato combinado de *Coptidis Rhizoma* com folha de hera mostram atividades antitússicas, expectorantes, anti-histamínicas, de supressão bronco-constricção, de supressão de hiperreatividade das vias aéreas, de supressão de oclusão brônquica no tecido pulmonar e de supressão de infiltração da célula inflamatória e, deste modo, podem ser usados para tratar, prevenir ou aliviar doenças respiratórias relacionadas. E o extrato combinado de

Coptidis Rhizoma com folha de hera é preferível porque o sinergismo pode ser obtido em comparação com cada extrato apenas.

[0059] A doença respiratória pode ser toda a doença que envolve tosse e escarro e, por exemplo, é selecionada a partir do grupo que consiste em tosse ou escarro comum; enfisema pulmonar envolvendo tosse ou escarro; bronquite tal como bronquite crônica, bronquite aguda, bronquite catarrosa, doença obstrutiva ou inflamatória brônquica etc.; asma tal como asma brônquica, asma atópica, asma atópica brônquica mediada por IgE, asma não atópica, asma alérgica, asma não alérgica etc.; bronco-constricção crônica ou aguda; síndrome do estríduo infantil; doença pulmonar obstrutiva crônica; adenoma brônquico; nódulo pulmonar solitário; tuberculose pulmonar; piotórax; abscesso pulmonar; resfriado comum; gripe; e histiocitose pulmonar.

[0060] A composição da presente invenção pode ser administrada a mamíferos incluindo a pessoa humana em várias rotas. Pode ser administrado usando o método comumente usado, por exemplo, pode ser administrado oralmente, intrarectalmente ou por via intravenosa, intramuscular, subcutânea, intra-uterina ou injeção intracerebroventricular. A composição da presente invenção pode ser formulada numa forma de dosagem oral tal como pó, grânulo, tablete, cápsula, suspensão, emulsão, xarope, aerossol etc. ou uma forma de dosagem parenteral tal como agente transdérmico, supositório e solução de injeção estéril etc.

[0061] A composição da presente invenção pode compreender, além disso, adjuvante farmacêuticamente apropriado e fisiologicamente aceitável tal como portador, excipiente e diluentes.

[0062] A composição da presente invenção pode ser administrada sozinha; porém, em geral, considerando a via de administração e prática farmacêutica padrão, pode ser administrada com um portador farmacêutico selecionado. Por exemplo, a composição pode ser admi-

nistrada oralmente, intrabucalmente ou sublingualmente na forma de tablete contendo lactose ou amido, cápsula apenas ou contendo excipiente, elixir contendo produtos químicos flavorizantes ou corantes ou suspensão. A formulação líquida pode ser formulada com aditivos farmacêuticamente aceitáveis tais como agente de suspensão (por exemplo, metilcelulose, glicerídeo semi-sintético tal como witepsol ou uma mistura de glicerídeos tal como uma mistura de óleo de núcleo de albricoque e éster de PEG-6 ou uma mistura de PEG-8 e glicerídeo caprílico/cáprico).

[0063] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um alimento funcional de saúde para suprimir a tosse, remover o escarro ou prevenir ou melhorar a doença respiratória tal como asma, compreendendo o extrato de *Coptidis Rhizoma* ou um extrato combinado de *Coptidis Rhizoma* com folha de hera. O alimento funcional de saúde pode ser alimento, bebida ou aditivos de alimentos etc.

[0064] O conteúdo do extrato como ingrediente ativo contido no alimento funcional de saúde pode ser apropriadamente variado dependendo da forma do alimento, uso desejado etc., sem limitações específicas. Por exemplo, pode ser adicionado numa quantidade de 0,01 a 15 % em peso da alimento total e, para composição de bebida de saúde, pode ser adicionado numa quantidade de 0,02 a 10g, de preferência de 0,3 a 1 g, com base em 100 mL da composição.

[0065] No caso em que a composição herbária da presente invenção é administrada ao corpo humano, considerando as propriedades gerais dos extratos naturais, acredita-se que não exista nenhuma preocupação de efeitos colaterais comparados com outros medicamentos sintéticos e, como resultados de testes de toxicidade prática, é comprovado não ter nenhuma influência sobre um corpo vivo.

Breve Descrição dos Desenhos

[0066] A **Figura 1** mostra atividades expectorantes do extrato de Coptidis Rhizoma e a fração ativa e ingredientes representativos da mesma através do método de secreção vermelha de fenol num modelo de camundongo.

[0067] A **Figura 2** mostra as atividades expectorantes dos extratos preparados no Exemplo 2, indicando os resultados medidos pelo método do vermelho de fenol usando um camundongo.

[0068] A **Figura 3** mostra as atividades antitússicas dos extratos preparados no Exemplo 2, indicando os resultados de testes de supressão de tosse usando uma cobaia.

[0069] A **Figura 4** mostra as atividades de supressão da broncoconstrição dos extratos preparados no Exemplo 2, indicando o relaxamento (%) para um indutor de constrição usando um brônquio extraído a partir de uma cobaia.

[0070] A **Figura 5** mostra os efeitos dos extratos dos Exemplos 2-7 sobre a oclusão brônquica no tecido pulmonar e as atividades de supressão da infiltração da célula inflamatória num tecido pulmonar de camundongo sensibilizado a OV A e testado ((a) grupo normal, (b) grupo induzido, (c) controle positivo, (d) exemplos 2~7).

Exemplos

[0071] A presente invenção será explicada em detalhe com referência aos exemplos e experimentos seguintes.

[0072] Contudo, os exemplos e experimentos seguintes são apenas para ilustrar a presente invenção e o escopo da presente invenção não é limitado a isso.

Exemplo 1 Preparação do Extrato de Coptidis Rhizoma

1-1 - Preparação do extrato de Coptidis Rhizoma usando

água1-1-1 - Preparação do extrato cru de Coptidis Rhizoma (CR-GA)

[0073] Coptidis Rhizoma comprado a partir do mercado Kyungdong foi lavado com água para remover impurezas e 250 g de Coptidis Rhizoma seco foram sujeitos a extração em água quente com 1,5 L de água a 80°C duas vezes cada durante 3 horas e então, o extrato foi filtrado e concentrado sob vácuo para obter 62,5 g de extrato cru (rendimento de 25% comparado com a erva crua), que foi chamado de 'CR-GA' e usado no Exemplo seguinte 1-2.

1-1-2 - Preparação de Extrato de Solvente-Soluto de Coptidis Rhizoma (CR-GA-I)

[0074] A 62,5g de CR-GA obtidos no Exemplo 1-1-1, foi adicionado 0,5L de água para suspendê-lo e foi adicionado 1 L de álcool butílico saturado em água a ele, para separar uma camada duas vezes, e, então, apenas a fração de álcool butílico saturado de água foi coletada e concentrada sob vácuo até à secura. Quando a maior parte do álcool butílico e água estavam evaporados, foi adicionado 0,4 L de água para concentrá-lo azeotropicamente, o que foi repetido duas vezes. E, finalmente, foi adicionado 0,1 L de água destilada para suspender o concentrado e, então, a suspensão foi liofilizada para obter 19,8g de extrato de Coptidis Rhizoma na forma de pó (rendimento de 7,92%, em comparação com a erva crua), que foi chamado de 'CR-GA-I' e usado como amostra nas Experimentos seguintes.

1-2 - Preparação do Extrato de Coptidis Rhizoma Usando Etanol a 50% (v/v)1-2-1 - Preparação de Extrato Cru de Coptidis Rhizoma (CR-GB)

[0075] Coptidis Rhizoma comprado a partir do mercado de e Kyungdong foi lavado com água para remover impurezas e 250g de Coptidis Rhizoma seco foram extraídos por refluxo com 2,0 L de solução aquosa de etanol 50% (v/v) a 80°C duas vezes cada durante 3 horas e, então, o extrato foi filtrado e concentrado sob vácuo para obter 57,5 g de extrato cru (rendimento de 23% em comparação com a erva crua), que foi chamado de 'CR-GB' e usado no Exemplo seguinte 2-2.

1-2-2 - Preparação de Extrato de Solvente-Soluto de Coptidis Rhizoma (CR-GB-I)

[0076] A 57,5g de CR-GB obtido no Exemplo 1-2-1, foram adicionados 0,3 L de água para suspendê-lo e 0,6 L de álcool butílico saturado em água foram adicionados a isso, para separar uma camada duas vezes e, então, apenas a fração de álcool butílico foi coletada e concentrada sob vácuo até à secura. Quando a maior parte do álcool butílico e da água estavam evaporados, foram adicionados 0,2 L de água para concentrar azeotropicamente, o que foi repetido duas vezes. E, finalmente, foram adicionados 0,2 L de água destilada para suspender o concentrado e, então, a suspensão foi liofilizada para obter 31,8g de extrato de Coptidis Rhizoma na forma de pó (rendimento de 12,7% em comparação com a erva crua), que foi chamado de 'CR-GB-I' e usado como amostra nas Experimentos seguintes.

1-3 - Preparação do Extrato de Coptidis Rhizoma Usando Álcool Butílico Saturado em Água

1-3-1 - Preparação do Extrato de Coptidis Rhizoma (CR-GC)

[0077] Coptidis Rhizoma comprado a partir do mercado de Kyungdong foi lavado com água para remover impurezas e 250g de Coptidis Rhizoma seco foram extraídos por refluxo com 2,5 L de álcool butílico saturado de água a 85°C duas vezes cada durante 3 horas e, então, o extrato foi filtrado e concentrado sob vácuo. Quando a maior

parte do álcool butílico tinha evaporado, 0,2 L de água foram adicionados para concentrar azeotropicamente, o que era repetido duas vezes. Finalmente, 0,2 L de água destilada foram adicionados para suspendê-lo e a suspensão foi liofilizada para obter 32,8 g de extrato em forma de pó (rendimento de 13,1% em comparação com a erva crua), que foi chamado de 'CR-GC' e usado nas Experimentos seguintes.

1-4 - Separação de Extrato de Coptidis Rhizoma

[0078] 20 g de CR-GBI obtivos no Exemplo 1-2-2 foram divididos em 5 frações por cromatografia em coluna de gel de sílica usando um solvente misturado de cloreto de metileno e metanol (30:1 -7:1 (v/v)). A Fr. 1 era de 0,8 g(em seguida, chamada de 'Fr. 1'), a Fr. 2 era de 2,6 g (em seguida, chamada de 'Fr. 2'), a Fr. 3 era de 5,5 g (em seguida, chamada de 'Fr. 3'), a Fr. 4 era de 2,8 g (em seguida, chamada de 'Fr. 4'), a Fr. 5 era de 6,5 g (em seguida, chamada de 'Fr. 5'), que foi usada como amostras nas Experimentos seguintes.

Exemplo 2. Preparação de Extrato Combinado de Coptidis Rhizoma com Folha de Hera

Preparação de Extrato de Folha de Hera

[0079] Folhas de hera (*Hedera helix*) foram lavadas com água para remover impurezas e secas completamente. A 250g da hera preparada, foram adicionados 3℥ de solução aquosa de etanol a 30% (v/v) e extraídos por refluxo durante 6 horas e, então, o extrato foi filtrado para coletar o filtrado. Ao resíduo, foram adicionados 2,5 L de solução aquosa de etanol a 30% (v/v), extraídos por refluxo a 80 °C durante 3 horas e os filtrados obtidos foram combinados com o filtrado previamente coletado e foi concentrado a vácuo. Quando a maior parte do solvente tinha evaporado, 0,2 L de água foram adicionados para concentrá-lo azeotropicamente, o que foi repetido duas vezes. E foi adicionada uma quantidade equivalente de água para suspendê-lo homoge-

neamente e, então, a suspensão foi liofilizada para obter 42,4g de extrato de folha de hera na forma de pó. O extrato de folha de hera obtido foi usado para a preparação de extrato combinado nos Exemplos seguintes 2-1 a 2-11.

Preparação do Extrato do Rizoma de Coptidis

[0080] O rizoma de Coptidis foi lavado com água para remover impurezas e completamente seco. A 250 g do rizoma Coptidis preparado, foram adicionados 2,0 L de solução aquosa de etanol a 50% (v/v) para extrair por refluxo a 80°C durante 3 horas. E, então, o extrato foi filtrado e concentrado sob vácuo para obter 57,5 g de extrato cru. E 0,3 L de água foram adicionados para suspender isto e 0,6 L de álcool butílico saturado em água foram adicionados, para separar uma camada duas vezes. E então, apenas a fração de álcool butílico foi coletada e concentrada sob vácuo até à secura. Quando a maior parte do álcool butílico e da água tinham evaporado, 0,2 L de água foram adicionados para concentrar azeotropicamente, o que foi repetido duas vezes. Finalmente, uma quantidade equivalente de água foi adicionada a isto para suspender e a suspensão foi liofilizada para obter 31,8 g de Coptidis Rhizoma, que foi usada para a preparação de extrato combinado nos Exemplos seguintes 2-1 a 2-11. 2-1.

2-1 - Preparação do Extrato Combinado (0.2:1)

[0081] O extrato de folha de hera acima preparado e o extrato de Coptidis Rhizoma foram misturados numa relação de peso de 0,2:1 (peso do extrato de folha de hera: peso do extrato de Coptidis Rhizoma). A fim de misturar homogeneamente, mais ou menos 2 a 3 vezes em peso de água foram adicionados ao extrato combinado e, então, foi concentrado sob vácuo a uma temperatura de 50 a 60°C. E uma quantidade equivalente de água foi adicionada novamente ao concentrado obtido para suspendê-lo homogeneamente e a suspensão foi liofilizada para preparar um extrato combinado na forma de pó.

2-2 - Preparação do Extrato Combinado (0,4:1)

[0082] Um extrato combinado foi preparado pelo mesmo método que o Exemplo de Preparação 1 acima, exceto que a relação do extrato de folha de hera preparada e do extrato de Coptidis Rhizoma foi mudada para 0,4:1 (peso do extrato de folha de hera: peso do Coptidis Rhizoma).

2-3 - Preparação do Extrato Combinado (1:1)

[0083] Um extrato combinado foi preparado pelo mesmo método que o Exemplo de Preparação 1 acima, exceto que a relação do extrato de folha de hera preparada e do extrato de Coptidis Rhizoma foi mudada para 1:1 (peso do extrato de folha de hera: peso do Coptidis Rhizoma).

2-4 - Preparação do Extrato Combinado (1,5:1)

[0084] Um extrato combinado foi preparado pelo mesmo método que o Exemplo de Preparação 1 acima, exceto que a relação do extrato de folha de hera preparada e do extrato de Coptidis Rhizoma foi mudada para 1,5:1 (peso do extrato de folha de hera: peso do Coptidis Rhizoma).

2-5 - Preparação do Extrato Combinado (2:1)

[0085] Um extrato combinado foi preparado pelo mesmo método que o Exemplo de Preparação 1 acima, exceto que a relação do extrato de folha de hera preparada e o extrato de Coptidis Rhizoma foi mudada para 2:1 (peso do extrato de folha de hera: peso do Coptidis Rhizoma).

2-6 - Preparação do Extrato Combinado (2,5:1)

[0086] Um extrato combinado foi preparado pelo mesmo método que o Exemplo de Preparação 1 acima, exceto que a relação do extrato de folha de hera preparada e do extrato de Coptidis Rhizoma foi mudada

da para 2,5:1 (peso do extrato de folha de hera: peso do Coptidis Rhizoma).

2-7 - Preparação do Extrato Combinado (3:1)

[0087] Um extrato combinado foi preparado pelo mesmo método que o Exemplo de Preparação 1 acima, exceto que a relação do extrato de folha de hera preparada e do extrato de Coptidis Rhizoma foi mudada para 3:1 (peso do extrato de folha de hera: peso de Coptidis Rhizoma).

2-8 - Preparação do Extrato Combinado (3,5:1)

[0088] Um extrato combinado foi preparado pelo mesmo método que o Exemplo de Preparação 1 acima, exceto que a relação do extrato de folha de hera preparada e do extrato de Coptidis Rhizoma foi mudada para 3,5:1 (peso do extrato de folha de hera: peso de Coptidis Rhizoma)

2-9 - Preparação do Extrato Combinado (4:1)

[0089] Um extrato combinado foi preparado pelo mesmo método que o Exemplo de Preparação 1 acima, exceto que a relação do extrato de folha de hera preparada e do extrato de Coptidis Rhizoma foi mudada para 4:1 (peso do extrato de folha de hera: peso de Coptidis Rhizoma).

2-10 - Preparação do Extrato Combinado (4,5:1)

[0090] Um extrato combinado foi preparado pelo mesmo método que o Exemplo de Preparação 1 acima, exceto que a relação do extrato de folha de hera preparada e do extrato de Coptidis Rhizoma foi mudada para 4,5:1 (peso do extrato de folha de hera: peso de Coptidis Rhizoma)

2-11 - Preparação do Extrato Combinado (5:1)

[0091] Um extrato combinado foi preparado pelo mesmo método que o Exemplo de Preparação 1 acima, exceto que a relação do extrato de folha de hera preparada e do extrato de *Coptidis Rhizoma* foi mudada para 5:1 (peso do extrato de folha de hera: peso de *Coptidis Rhizoma*).

Exemplo 3. Experimento da Atividade do Extrato de *Coptidis Rhizoma*

3-1 – Medição da Atividade Expectorante do Extrato de *Coptidis Rhizoma*

Método do Experimento

[0092] A fim de medir as atividades expectorantes do extrato de *Coptidis Rhizoma* dos Exemplos de 1-1 a 1-3, foi conduzido um experimento usando o Método de Engler *et al.* (Engler H, Szelenyi I, *J. Pharmacol. Meth.* **11**, 151-157, 1984, ; Bao-quin Lin *et al.*, *Pulmonary Therapeutics and Pharmacology* **21**, 259-263, 2008.) no procedimento seguinte.

[0093] Uma droga de controle positivo (ambroxol, Sigma) e drogas de teste (extrato de *Coptidis Rhizoma* dos Exemplos de 1-1 a 1-3) foram oralmente administradas a um camundongo (idade de 8 semanas, Samtako BioKorea) e, depois de 30 minutos, 500 mg/kg de fenol vermelho foram intraperitonealmente injetados (o fenol vermelho foi dissolvido em solução salina). Depois de 30 minutos, o camundongo foi anestesiado com dietil éter, privado de sangue por corte da aorta abdominal e, então, a traquéia inteira foi removida. A traquéia separada foi posta em 1 ml de solução salina e lavada por 30 minutos, centrifugada a 10.000 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos, foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) 1 N ao sobrenadante (adicionando 0,1 ml de NaOH 1N por 1 ml de sobrenadante) e, então, absorvância foi medida a 546 nm para medir a atividade expectorante como concentração de fenol vermelho.

Resultados do Experimento

[0094] Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1 seguinte.

Tabela 1

		Dosagem (mg/kg)	Capacidade de segregar escarro (%)
Exemplo 1-1	CR-GA	500	29
	CR-GA-1	500	36
Exemplo 1-2	CR-GB	500	32
	CR-GB-1	500	41
Exemplo 1-3	CR-GC	500	38
Controle positivo (Ambrosol)		250	32

[0095] Como resultados da experimento, conforme mostrado na Tabela 1 acima, os extratos tiveram atividades excelentes como um todo, particularmente o CR-GB-I do Exemplo 2 mostrou a atividade de secreção de escarro de maior excelência.

[0096] E foram medidas as atividades de CR-GC-I do Exemplo 2 de acordo com a dosagem (50, 100, 150, 200, 500 mg/kg), cujos resultados são apresentados na Tabela 2 seguinte.

Tabela 2

		Dosagem (mg/kg)	Capacidade de segregar escarro (%)
Exemplo 1-2	CR-GB-1	50	4
		100	22
		150	32
		200	33
		500	41
Controle positivo (Ambrosol)		250	30

[0097] Como resultados da experimento, conforme mostrada na Tabela 2 acima, CR-GB-1 do Exemplo 1-2 mostrou a atividade de secreção de escarro de maior excelência numa dosagem de 500 mg/kg.

3-2 – Medição da Atividade Antitússica do Extrato de Coptidis Rhizoma.

Método do Experimento

[0098] A fim de medir a atividade antitússica do extrato de Coptidis Rhizoma dos Exemplos de 1-1 a 1-3, foi conduzida uma experimento usando o Método de Tanaka *et al.* (Motomu Tanaka e Kei Maruyama., *J. Pharmacol. Sci.* **93**, 465-470, 2003., Daoui, Cognon, Naline et., *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **158**, 42-48, 1998) no procedimento seguinte.

[0099] Uma droga de teste foi oralmente administrada a uma cobaia (idade de 6 semanas, Sam tako BioKorea) e, depois de 1 hora, a cobaia foi posta numa câmara de pletismógrafo (Buxco, E.U.A.) e, então,

um indutor de tosse, ácido cítrico (Sigma) foi nebulizado para induzir tosse. Como controle positivo, foi usada teobromina (Sigma) que é usada como um antitússico. E a cobaia foi exposta a ácido cítrico 0,2M durante 10 minutos e o número de tosse ocorridas foi medido por 15 minutos.

Resultado do Experimento

[00100] Os resultados são apresentados na Tabela 3 seguinte.

Tabela 3

		Dosagem (mg/kg)	Capacidade de segregar escarro (%)
Exemplo 1-1	CR-GA	200	33
	CR-GA-1	200	46
Exemplo 1-2	CR-GB	200	35
	CR-GB-1	200	52
Exemplo 1-3	CR-GC	200	44
Controle positivo (Teobromina)		50	57

[00101] Como resultados dos experimentos, conforme mostrado na Tabela 3 acima, os extratos tiveram atividades excelentes como um todo e, particularmente, CT-GB-I do Exemplo 1-2 mostrou atividade de supressão de tosse de maior excelência.

[00102] E as atividades de CR-GB-I do Exemplo 1-2 foram medidas de acordo com a dosagem (50, 100, 150, 200 mg/kg), cujos resultados são apresentados na Tabela 4 seguinte.

Tabela 4

		Dosagem (mg/kg)	Capacidade de segregar escarro (%)
Exemplo 1-2	CR-GB-1	50	7
		100	25
		150	37
		200	52
Controle positivo (Teobromina)		50	57

[00103] Como resultados dos experimentos, conforme mostrado na Tabela 4 acima, CR-GB-I do Exemplo 1-2 mostrou a atividade de supressão de tosse de maior excelência numa dosagem de 200 mg/kg.

3-3 – Medição da Atividade Anti-Histamínica do Extrato de Coptidis Rhizoma

Método do Experimento

[00104] A fim de medir a atividade anti-histamínica do extrato de Coptidis Rhizoma dos Exemplos de 1-1 a 1-3, foi conduzido um experimento usando o Método de Honuchi *et al.* (Masako Honuchi e Yoshiyuki Seyama, *J. Health Sci.*, **52**(6), 711-717, 2006., Naoki Inagaki *et al. Biol. Pharm. Bull.* **24**(7), 829-834, 2001.) no procedimento seguinte.

[00105] O efeito anti-histamínico foi mensurado usando a célula masto peritoneal masto de uma ratazana macho (idade de 7 semanas, Sam tako BioKorea) sensibilizado com ovalbumina. Como controle positivo, foi usado Ketotifen (Sigma). A uma ratazana sensibilizada com ovalbumina, foi oralmente administrado Ketotifen numa concentração

de 5 mg/kg e foram oralmente administradas drogas de teste respectivamente numa concentração de 200 mg/kg por 4 dias e, então, foram separadas células masto peritoneais. As células masto peritoneais separadas (2×10^5 cells/ml) foram tratadas com Ketotifen em concentrações de 0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml e 1,0 mg/ml e drogas de teste em concentrações de 0,1 mg/ml, 1,0 mg/ml e 10 mg/ml. Finalmente, as células masto foram tratadas com o composto 48/80 (Sigma) que ativa a liberação de histamina não imunológica numa concentração de 10 µg/ml. Neste momento, a quantidade de histamina liberada a partir das células masto foi quantificada para examinar se os materiais de teste suprimem a liberação de histamina a partir das células masto. A quantidade relativa de histamina liberada a partir das células masto numa ratazana a que nenhuma droga foi administrada foi medida, cujos resultados são apresentados na Tabela 5 seguinte.

Tabela 5

		Dosagem oral (mg/kg)	Concentração do tratamen- to de células masto (mg/ml)	Quantidade de liberação da histam- nina (%)
Exemplo 1-1	CR-GA	200	0	41
			0,1	38
			1,0	33
			10,0	26
	CR-GA-1	200	0	44
			0,1	35
			1,0	29
			10,0	23
Exemplo 1-2	CR-GB	200	0	42
			0,1	38
			1,0	31
			10,0	27
	CR-GB-1	200	0	39
			0,1	34
			1,0	27
			10,0	21

Exemplo 1-3	CR-GC	200	0	41
			0,1	37
			1,0	30
			10,0	22
Controle Positivo (Ketotifen)		5	0	43
			0,01	41
			0,1	32
			1,0	18

[00106] Como resultados dos experimentos, conforme mostrado na Tabela 5 acima, os extratos como um todo tiveram excelentes atividades e particularmente, CR-GB-I do Exemplo 1-2 mostrou a atividade anti-histamínica de maior excelência.

[00107] E as atividades de CR-GB-I do Exemplo 1-2 foram medidas de acordo com a dosagem (100, 200, 400 mg/kg), cujos resultados são apresentados na Tabela 6 seguinte.

Tabela 6

		Dosagem oral (mg/kg)	Concentração do tratamen- to de células masto (mg/ml)	Quantidade de liberação da hista- mina (%)
Exemplo 1-1	CR-GB-1	100	0	49
			0,1	40
			1,0	36
			10,0	30
		200	0	42
			0,1	34
			1,0	27
			10,0	21
		400	0	31
			0,1	26
			1,0	23
			10,0	18
		Controle Positivo (Ketotifen)		5
			0,01	41
			0,1	32
			1,0	18

[00108] Como resultados dos experimentos, conforme mostrado na Tabela 6 acima, CR-GB-I do Exemplo 1-2 mostrou a atividade anti-histamínico de maior excelência numa dosagem de 400 mg/kg.

3-4 - Medida das Atividades Antitússicas de Sub-Frações

Ativas

[00109] A fim de medir as atividades antitússicas de 5 sub-frações preparadas no Exemplo 1-4 acima, foram conduzidos experimentos para a atividade antitússica pelo mesmo método que o Experimento 3-2, cujos resultados são apresentados na Tabela 7 seguinte.

Tabela 7

		Dosagem (mg/kg)	Capacidade de supressão da tosse (%)
Fr. 1		60	41
Fr. 2		60	32
Fr. 3		60	62
Fr. 4		60	34
Fr. 5		60	24
Controle Positi- vo	Teobromina	50	57

[00110] Como resultados do experimento, conforme mostrado na Tabela 7, as frações tiveram atividades excelentes como um todo e particularmente, a Fr.3 mostrou a de maior excelência atividade anti-tússica.

3-5 –Medição das Atividades Anti-Histamínicas de Sub-Frações Ativas

[00111] A fim de medir as atividades anti-histamínicas de 5 sub-frações preparadas no Exemplo 1-4 acima, o mesmo experimento foi conduzido como o Experimento 3-3 acima, cujos resultados são apresentados na Tabela 8 seguinte.

Tabela 8

	Dosagem oral (mg/kg)	Concentração do tratamento de células masto (mg/ml)	Quantidade de liberação da histamnina (%)
Fr. 1	60	0	55
		0,1	50
		1,0	42
		10,0	39
Fr. 2	60	0	59
		0,1	54
		1,0	48
		10,0	41
Fr. 3	60	0	38
		0,1	31
		1,0	26
		10,0	19
Fr. 4	60	0	56
		0,1	50
		1,0	44
		10,0	40

Fr. 5	60	0	66
		0,1	62
		1,0	55
		10,0	51
Controle Positivo	5	0	43
		0,01	41
		0,1	32
		1,0	18

[00112] Como resultados do experimento, conforme mostrado na Tabela 8 acima, as frações tiveram atividades excelentes como um todo e, particularmente, a Fr.3 mostrou a de maior excelência atividade anti-histamínica.

3-6 - Análise de Compostos do Extrato de Coptidis Rhizoma

[00113] A fim de analisar os compostos dos extratos de Coptidis Rhizoma e de frações dos mesmos dos Exemplos acima, foram conduzidos experimentos usando análise físicoquímica tais como HPLC, LC/MS, espectrômetro de UV e FT-NMR.

[00114] Como resultado, foi identificado que a berberina, a palmatina, a coptisina, a columbamina e a jatrorrizina são contidas no extrato de Coptidis Rhizoma. Os conteúdos dos extratos de compostos de Coptidis dos Exemplos de 1-1 a 1-4 foram analisados, cujos resultados são apresentados na Tabela 9 seguinte.

[00115] A cromatografia líquida de alto desempenho foi medida usando o modelo 2695 da Waters Alliance usando Waters PDA 2996.

Como coluna, foi usada YMC Hydrosphere 18, S-5 μ m, 120 nm, 4,6x250mm ID e a temperatura da amostra foi mantida a 25°C $\pm$ 1 e a temperatura da coluna foi mantida a 30°C $\pm$ 1. Uma concentração da amostra era de 1 mg/ml, a quantidade de injeção era de 10 μ l e a taxa de fluxo era de 1,0ml/minuto. Como materiais padrão, para a berberina, a palmatina e a coptisina, aqueles comercializados eram comprados a partir da Sigma Company e usados e, para a columbamina e a jatrorizina, foram usados aqueles purificados a partir de *Coptidis Rhizoma*. A fase móvel era condição de gradiente de 0,2% de solução de ácido fosfórico (solvente A) e metanol (solvente B) de 0~60 minutos (A:B=9:1~6:4), 60~70 minutos (A:B=6:4~5:5), 70~90 minutos (A:B=5:5~0:10). Os conteúdos dos compostos nos extratos são indicados pela relação de área para cada material padrão em percentual ponderal.

Tabela 9

		Conteúdo dos compostos (%)				
		Berberina	Palmatina	Coptisina	Columbamina	Jatrorizina
Exemplo 1-1	CR-GA	15,6	4,2	4,3	0,6	0,6
	CR-GA-1	25,3	4,5	4,7	0,6	0,5
Exemplo 1-2	CR-GB	22,8	5,6	6,5	1,5	0,9
	CR-GB-1	27,0	7,1	5,2	0,9	0,8
Exemplo 1-3	CR-GC	30,9	7,8	6,2	1,1	1,0
Exemplo 1-4	Fr. 1	0,5	0,2	0,1	0,1	0,1
	Fr. 2	10,1	6,7	0,8	0,1	0,1
	Fr. 3	47,0	21,4	3,7	3,2	1,5
	Fr. 4	5,2	1,4	18,0	0,1	2,6
	Fr. 5	0,1 ou menos	0,1 ou menos	0,1 ou menos	0,1 ou menos	0,1 ou menos

[00116] Como mostrado na Tabela 9 acima, como resultados da comparação dos conteúdos de compostos principais de acordo com os extratos e frações, foi identificado que estavam contidas de 0,5 a 47,0

partes em peso de berberina, de 0,2 a 21,4 partes em peso de palmatina, de 0,1 a 18,0 partes em peso de coptisina, de 0,1 a 3.2 partes em peso de columbamina e de 0,1 a 2,6 partes em peso de jatrorrizina.

3-7 - Medida da Atividade Expectorante da Berberina

[00117] A fim de medir as atividades expectorantes dos extratos de *Coptidis Rhizoma* dos Exemplos 1-2 e 1-3 e 5 sub-frações preparadas no Exemplo 1-4, foi conduzido o mesmo experimento para a atividade expectorante como a Experimento 1 acima, cujos resultados são apresentados na Tabela seguinte 10, e um gráfico de barras para as atividades é mostrado na Figura 1.

Tabela 10

	Dosagem (mg/kg)	Capacidade de descarregar escarro (%)
Fr. 1	125	25
Fr. 2	125	22
Fr. 3	125	44
Fr. 4	125	24
Fr. 5	125	10
CR-GB Exemplo 1-2	125	32
CR-GB-1 Exemplo 1-2	125	38
CR-GC Exemplo 1-3	125	37
Berberina	125	39
Controle Positivo - Ambroxol	250	34

Exemplo 4: Teste de Atividade do Extrato Combinado de Coptidis Rhizoma com Folha de Hera

4-1 – Medição da Atividade Expectorante

[00118] A fim de avaliar as atividades expectorantes do extrato combinado e do extrato único preparados no Exemplo 2 (de 2-1 a 2-11), foi conduzido um experimento pelo mesmo método descrito no Método do Experimento do Experimento 3-1, usando o Método de Engler *et al.* (Engler H, Szelenyi I, *J.Pharmacol. Moth.* **11**, 151-157, 1984, Bao-quin Lin *et.*, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **21**, 259-263, 2008), cujos resultados são mostrados na Figura 2. Na Figura 2, para controle positivo, o Ambroxol foi oralmente administrado numa dosagem de 250 mg/kg e as drogas de teste restantes foram oralmente administradas numa dosagem de 500 mg/kg. E, para o extrato do Exemplo 2-7 que mostrou a de maior excelência atividade, as atividades expectorantes foram medidas de acordo com a dosagem, cujos resultados são apresentados na Tabela seguinte 11.

Tabela 11

	Dosagem (mg/kg)	Capacidade de descarregar escarro (%)
Exemplo 2-7	50	17
	100	30
	150	38
	200	44
	500	56
Controle Positivo - Ambroxol	250	34

[00119] Como mostrado na Figura 2, todos os extratos combinados dos Exemplos de 2-1 a 2-11 exibiram efeitos expectorantes melhorados em comparação com o extrato de folha de hera sozinho, a partir do que pode ser identificado que ocorre sinergismo para a atividade farmacológica por combinação do extrato de *Coptidis Rhizoma* e do extrato de folha de hera.

[00120] Particularmente, os Exemplos de 2-3 a 2-9 exibiram efeitos expectorantes de maior excelência do que o expectorante existente Ambroxol, a partir do que é mostrado que se o extrato de folha de hera e o extrato de *Coptidis Rhizoma* são combinados numa relação ponderal de 1:1 a 4:1, mais efeitos expectorantes aumentados podem ser obtidos.

[00121] A Tabela 11 acima mostra os resultados de avaliações para as atividades do Exemplo 2-7 tendo a atividade mais elevada de acordo com a dosagem e é identificado que o material do Exemplo 2-7 tem capacidade de maior excelência de secretar escarro do que a droga de

controle positivo. Particularmente, o material do Exemplo 2-7 exibe efeito semelhante para o controle positivo numa dosagem de 100 mg/kg ou mais e de maior excelência do que controle positivo numa dosagem de 150 mg/kg ou mais.

4-2 – Medição da Atividade Antitússica

[00122] A fim de medir as atividades antitússicas do extrato de folha de hera e do extrato combinado de *Coptidis Rhizoma* com folha de hera (Exemplos de 2-1 a 2-11) preparados no Exemplo 2, foi conduzido um experimento pelo mesmo método descrito no Método do Experimento no Experimento 3-2 usando o Método de Tanaka *et al.* (Motomu Tanaka e Kei Maruyama., *J. Pharmacol. Sci.* **93**, 465-470, 2003., Daoui, Cognon, Naline et., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, 42-48, 1998), cujos resultados são mostrados na Figura 3.

[00123] Na Figura 3, para controle positivo, a Teobromina foi oralmente administrada numa concentração de 50 mg/kg e as restantes drogas de teste foram oralmente administradas numa concentração de 200 mg/kg. E, para o Exemplo 2-7 que mostra a atividade de maior excelência, as atividades antitússicas foram avaliadas de acordo com a dosagem, cujos resultados são apresentados na Tabela 12 seguinte.

Tabela 12

	Dosagem (mg/kg)	Capacidade de descarregar escarro (%)
Exemplo 2-7	50	29
	100	51
	150	69
	200	83
Controle Positivo - Ambroxol	250	34

[00124] Como mostrado na Figura 3, todos os extratos combinados dos Exemplos de 2-1 a 2-11 exibiram efeitos antitússicos mais aumentados do que o extrato de folha de hera só, a partir do que é identificado que ocorre sinergismo para a atividade farmacológica por combinação do extrato de *Coptidis Rhizoma* com o extrato de folha de hera. Particularmente, os Exemplos de 2-3 a 2-9 exibiram efeitos antitússicos de maior excelência do que a Theobromine antitússica existente, a partir de que é mostrado que, se o extrato de folha de hera e o extrato de *Coptidis Rhizoma* forem combinados numa relação de peso de 1:1 a 4:1, podem ser obtidos efeitos antitússicos de maior excelência.

[00125] E a Tabela 12 acima mostra os resultados de avaliação para as atividades do Exemplo 2-7 tendo atividade mais alta de acordo com a dosagem, a partir do que é mostrado que o material do Exemplo 2-7 exibe efeito semelhante ao controle positivo a uma dosagem de 100mg/kg ou mais e de maior excelência do que controle positivo a uma dosagem de 150 mg/kg.

4-3 - Medida do Efeito Anti-Histamínico

[00126] A fim de medir o efeito anti-histamínico do extrato de folha de hera e do extrato combinado de *Coptidis Rhizoma* com folha de hera (Exemplos de 2-1 a 2-11) preparados no Exemplo 2 em célula de masto, foram conduzidos experimentos pelo mesmo método que o descrito em no Método do Experimento no Experimento 3-3 usando o Método de Honuchi *et al.* (Masako Honuchi e Yoshiyuki Seyama, *J. Health Sci.*, **52**(6), 711-717, 2006., Naoki Inagaki *et. Biol. Pharm. Bull.* **24**(7), 829-834, 2001), cujos resultados são apresentados na Tabela 13 seguinte. E, para o Exemplo 2-7 que mostra a atividade de maior excelência, os efeitos anti-histamínicos foram mensurados de acordo com a dosagem e os resultados são apresentados na Tabela 14 seguinte.

Tabela 13

	Dosagem oral (mg/kg)	Concentração do tratamento de células masto (mg/ml)	Quantidade de liberação da histamnina (%)
Exemplo 2-1	200	0	48
		0,1	42
		1,0	39
		10,0	32
Exemplo 2-2	200	0	47
		0,1	41
		1,0	38
		10,0	31
Exemplo 2-3	200	0	41
		0,1	37
		1,0	34
		10,0	28
Exemplo 2-4	200	0	39
		0,1	37
		1,0	33
		10,0	26

Exemplo 2-5	200	0	37
		0,1	34
		1,0	31
		10,0	25
Exemplo 2-6	200	0	36
		0,1	34
		1,0	31
		10,0	24
Exemplo 2-7	200	0	34
		0,1	32
		1,0	29
		10,0	20
Exemplo 2-8	200	0	35
		0,1	33
		1,0	30
		10,0	22
Exemplo 2-9	200	0	38
		0,1	35
		1,0	31
		10,0	27
Exemplo 2-10	200	0	42

		0,1	39
		1,0	36
		10,0	31
Exemplo 2-11	200	0	49
		0,1	44
		1,0	39
		10,0	30
Extrato de folha de hera	200	0	45
		0,1	40
		1,0	35
		10,0	34
Controle Positivo - Ketotifen	5	0	44
		0,01	41
		0,1	32
		1,0	19

Tabela 14

	Dosagem oral (mg/kg)	Concentração do tratamento de células masto (mg/ml)	Quantidade de liberação da histamnina (%)
Exemplo 2-7	100	0	49
		0,1	39
		1,0	35
		10,0	34
	200	0	34
		0,1	32
		1,0	29
		10,0	20
	400	0	21
		0,1	18
		1,0	17
		10,0	17
Extrato de folha de hera	200	0	45
		0,1	40
		1,0	35
		10,0	34

Controle Positivo - Ketotifen	5	0	44
		0,01	41
		0,1	32
		1,0	19

[00127] Como mostrado na Tabela 13, é identificado que o extrato de folha de hera e os extratos combinados dos Exemplos de 2-1 a 2-11 têm efeito anti-histamínico. Particularmente, é mostrado que se o extrato de folha de hera e o extrato de *Coptidis Rhizoma* respectivamente que exibem atividade anti-histamínica forem combinados, ocorre sinergismo. E a Tabela 14 acima mostra os resultados da avaliação do Exemplo 2-7 tendo a atividade de maior excelência de acordo com a dosagem e é mostrado que o material do Exemplo 2-7 exibe excelente atividade anti-histamínica.

4-4 - Experimento Para a Supressão da Bronco-Constricção (in vitro)

[00128] A fim de medir os efeitos da supressão da bronco-constricção do extrato de folha de hera e os extratos combinados de *Coptidis Rhizoma* com folha de hera (Exemplos de 2-1 a 2-11) preparados no Exemplo 2, foi conduzido um experimento usando método de Casoni GL *et al.* (*Clin Exp. Allergy*, **33**, 999-1004, 2003, *Anesth Analg.*, **89**, 191-196, 1999, *Br J Pharmacol*, **128**, 577-584, 1999) no procedimento seguinte.

[00129] Pentobarbital de sódio (75/ mg/kg) foi administrado intra-peritonealmente numa cobaia de Hartely (350-400 g, Daehan Biolink) para anestesiá-la e, então, a traquéia foi extraída. A traquéia extraída foi cortada em mais ou menos 3-5 mm em solução de Krebs-Henseleit

para dividir em segmentos e, então, fixada num banho de órgão e perfundida com histamina 10^{-4} M para constringir a traquéia extraída. E, então, o material do experimento (0,50mg/ml) foi-lhe adicionado para medir a mudança no grau de tensão da traquéia extraída. Como droga de controle positivo, foi usado dihidrato de nitroprusseto de sódio numa concentração de $2,6 \times 10^{-5}$ mg/ml. Supondo a constrição induzida pela histamina 10^{-4} M como 100%, as taxas de relaxamento (%) dos grupos a que foi administrado material do experimento e o grupo a que foi administrada a droga de controle positivo foram calculadas subtraindo a taxa de relaxamento (%) do grupo de controle do excipiente a partir da taxa de relaxamento (%) do grupo a que foi administrado material de experimento e do grupo a que foi administrada a droga de controle positivo obtido sob as mesmas condições. As taxas calculadas de relaxamento de brônquios (atividade de supressão da broncoconstrição) foram mostradas na Figura 4 e para o Exemplo 2-7 que mostra a atividade de maior excelência, as taxas de relaxamento da traquéia foram medidas de acordo com a dosagem e os resultados são apresentados na Tabela seguinte 15.

Tabela 15

		Concentração (mg/ml)	Taxa de relaxamento do brônquio (%)
Exemplo 2-7		0,25	20
		0,50	48
		1,00	83
Controle Positivo - Ketotifen	SNP	$2,6 \times 10^{-5}$	30

[00130] Como mostrado na Figura 4, é identificado que o extrato de folha de hera e os extratos combinados de Exemplos 2-1 a 2-11 têm efeito de supressão da bronco-constricção. E é mostrado que todos os extratos combinados dos Exemplos de 2-1 a 2-11 exibem supressão da bronco-constricção mais aumentada do que o extrato de folha de hera só. A Tabela 15 acima mostra os resultados da avaliação das atividades do Exemplo 2-7 tendo as atividades de maior excelência de acordo com a dosagem, a partir do que é mostrado que o material do Exemplo 2-7 exibe excelente supressão da bronco-constricção.

4-5 - Experimento Para o Efeito Anti-Asma Usando um Modelo de Asma de Murino

[00131] A fim de confirmar o efeito anti-asma usando um modelo de asma de murino do extrato combinado do Exemplo 2-7 que mostrou os efeitos de maior excelência nos Experimentos de 4-1 a 4-4, foi conduzido um experimento usando Método de Tang M.L.K. *et al.* (*Pulmonary pharmacology & Therapeutics*, **14**, 203-210, 2001, *Immunology and Cell Biology* **79**, 141-144, 2001, *Journal of Experimental Medicine* **189**(10), 1621-1629, 1999). E, para avaliação, foram conduzidos exame de hiperresposta das vias aéreas (AHR) à metacolina, exame do valor IgE no plasma do sangue, exame do número de células e a distribuição de células brancas do sangue no fluido de lavagem broncoalveolar (BALF), observação do tecido pulmonar e RT-PCR(IL- 1 β , IL-4, IL-13r2a).

Método do Experimento

[00132] Para um camundongo Balb/c(18 ~ 21 g, Orientbio Inc.), uma solução de ovalbumin (OVA, Sigma) preparada para injeção intraperitoneal foi administrada intraperitonealmente numa quantidade de 500 μ l (20 μ g como OVA) por um camundongo no Dia 0 e Dia 7 e foi sensibilizado com uma solução preparada para inalação de OVA usando um nebulizador (NE-U17, OMRON Co Ltd., Japão) e então, a solução OVA a 5% preparada foi inalada a cada dia por 30 minutos desde o Dia

14 até o Dia 20. Como droga de controle positivo, foram usados 30 mg/kg de montelukast de sódio e todos os materiais do experimento foram usados numa quantidade de 200 mg/kg. E a droga de controle positivo e os materiais do experimento foram administrados oralmente a cada dia uma hora antes da inalação de OVA durante 7 dias desde o Dia 14 até o Dia 20 depois da sensibilização e, então, foram conduzidos experimentos pelos itens da avaliação seguinte.

1) Exame da hiperresposta das vias aéreas (“AHR”) para a metacolina

[00133] 24 horas depois da inalação final de OVA (no Dia 21), o camundongo foi posto num pletismógrafo de corpo inteiro (BUXCO, EUA), cada 0,4 ml de soluções de metacolina de concentrações 0, 10 e 20 mg/ml foram tomados para introduzir num aerossol e inalados pelo camundongo respectivamente por 3 minutos. E foram medidos os Penh por 4 minutos a partir do momento da inalação e o valor médio foi configurado como Penh (pausa intensificada) na dosagem correspondente da metacolina.

2) Exame do Valor de IgE no Plasma Sanguíneo (Dia 21)

[00134] Para o animal mensurado de acordo com 1), foram coletados cerca de 0,05 ml de sangue por amostragem de sangue orbital e centrifugados e o plasma obtido foi dividido em duas partes e diluído a 1:10 para examinar o valor da imunoglobulina E (IgE) no plasma através do ensaio imunossorvente ligado à enzima de IgE (ELISA; Kit de ELISA IgE para camundongo, MIM-151, SHIBAYAGI Co.,Ltd., JAPÃO).

3) Exame do Número de Células e a Distribuição de Células Brancas do Sangue no Fluido de Lavage Broncoalveolar (BALF) (Dia 22)

[00135] Para os animais cujo sangue foi amostrado de acordo com 2), foi injetado intraperitonealmente pentotal de sódio (50mg/kg) para anestesiá-los. E, então, enquanto se prendia o pulmão esquerdo com

pinças, 0,4 ml de solução de PBS foi injetada nos brônquios e pulmão e, então, extraída e a sua solução lavada foi tomada, o que foi repetido três vezes. E a solução foi centrifugada a 1.500 g e o sobrenadante foi descartado e, então, 0,2 ml de PBS foram adicionados ao precipitado para suspendê-lo novamente. Para a suspensão, foram medidos os números totais de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos usando analisadores automatizados de hematologia (contador coulter Advia 120, BAYER, Alemanha).

4) Observação do Tecido Pulmonar

[00136] O pulmão esquerdo fixado com uma pinça foi retirado e fixado com uma solução de formalina a 10% por um dia e, então, o tecido penetrado com parafina usando um processador de tecidos foi cortado a uma espessura de 3-4µm usando um micrótomo para fazer fragmentos de tecido. O corte preparado foi corado com eosina e o corte de cobertura foi revestido com bálsamo e observado com um microscópio para examinar o grau de oclusão do bronquíolo e a infiltração de células inflamatórias.

5) RT-PCR

[00137] O tecido do pulmão direito foi retirado rapidamente e armazenado a -80°C antes do experimento. O RNA foi separado a partir do tecido usando RNA-Bee (Tel-Test Inc.USA) e o RNA separado foi quantificado a 260nm usando um espectrômetro e, então, 4µg de RNA e Oligo dT 2ul (Promega), água DEPC foram adicionados para perfazer 10 ul e a mistura foi reagida a 65°C durante 5 minutos. E, então, foram introduzidos 5x tampão de reação 5 ul + Rtase 2ul + dNTP 5 ul + inibidor da RNase 1 ul + água DEPC 2 ul e o total 25 ul de uma mistura foi reagido a 42°C por 1 hora e a 100°C por 5 minutos para preparar cDNA. Todos os reativos usados foram comprados de Promega. A PCR foi conduzida com iniciadores preparados (IL-1β, IL-4, IL-13r2a). Os iniciadores usados são como se segue:

IL-1 β *forward*: 5'-TCATGGGATGATGATGATAACCTGCT-3'
(Seqüência No. 1),

IL- 1 β *reverse*: 5'-CCCATACTTTAGGAAGACACGGATT-3' (Seqüência No. 2);

IL-4 *forward*: 5'-TCATCGGCATTTTGAACGAG-3' (Seqüência No. 3),

IL-4 *reverse*: 5'-GAATCCAGGCATCGAAAAGC-3' (Seqüência No. 4);

IL-13r2a *forward*: 5'-GGTTATGCCAAATGCACTTGAG-3' (Seqüência No. 5),

IL-13r2a *reverse*: 5'-ATGGCTTTTTGTGCATATCAGAT-3' (Seqüência No. 6).

[00138] As condições de PCR fazem 32 ciclos de 94° 30 segundos, 56°C 30 segundos e 72 °C 1 minuto. O reagente de PCR foi sujeito a eletroforese sobre um gel de agarose a 2% e corado com EtBR e, então, foi irradiado UV e a densidade foi comparada e dividido pela densidade da actina para analisar o valor.

Resultados do Experimento

1) Exame da Hiperresposta das Vias Aéreas (AHR) à Metacolina

[00139] As hiperrespostas ao ar para a metacolina de montelukast (do DR. REDDY) usaram, como droga de controle positivo, o extrato de folha de hera e os extratos combinados dos Exemplos 2-7 são apresentados na Tabela 16 seguinte.

Tabela 16

	Valor Penh de acordo com a dosagem da metacolina		
	0 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml
Grupo normal	1,2±0,1	1,7±0,2	6,0±2,4
Grupo induzido	1,5±0,2	14,3±3,0	29,7±12,2
Exemplos 2-7 (200 mg/kg)	1,5±0,2	7,5±2,1	15±4,9
Extrato de folha de hera (200 mg/kg)	1,4±0,2	8,2±2,5	18,1±5,9
Controle positivo – montelukast (30 mg/ml)	1,5±0,2	8,4±2,4	19,8±5,4

[00140] Como mostrado na Tabela 16 acima, os extratos combinados dos Exemplos 2-7 exibem efeito de maior excelência para suprimir a hiperresposta das vias aéreas do que o extrato de folha de hera só.

2) Exame do Valor IgE no Plasma

[00141] Os valores de IgE no plasma de montelukast (do DR. REDDY) usaram, como droga de controle positivo, o extrato de folha de hera e os extratos combinados dos Exemplos 2-7 de acordo com as concentrações são apresentados na Tabela 17 seguinte.

Tabela 17

		Nível de IgE (nm/ml)
Grupo normal		0,6±0,2
Grupo induzido		19,7±6,1
Exemplos 2-7 (200 mg/kg)		9,6±3,2
Extrato de folha de hera (200 mg/kg)		11,0±4,8
Controle positivo –	montelukast (30 mg/ml)	13,7±5,7

[00142] Como mostrado na Tabela 17 acima, o grupo que recebe os materiais dos Exemplos 2-7 da presente invenção tem valor de IgE mais baixo, que medeia a inflamação, do que o grupo que recebe o extrato de folha de hera só e o grupo que recebe a droga de controle positivo.

3) Número de Células no Fluido de Lavagem Broncoalveolar (BALF)

[00143] Os números de neutrófilos e eosinófilos no fluido de lavagem broncoalveolar (BALF) de montelukast (do DR. REDDY) usados como uma droga de controle positivo, extrato de folha de hera e os extratos combinados dos Exemplos 2-7 de acordo com as concentrações são apresentados na Tabela 18 seguinte.

Tabela 18

		WBC (células x 10 ³)	
		NEU	EOS
Grupo normal		16,3±3,4	4,7±2,7
Grupo induzido		24,0±6,1	414,7±168,2
Exemplos 2-7 (200 mg/kg)		16,3±11,3	296,7±300,1
Extrato de folha de hera (200 mg/kg)		18,7±7,1	369,3±232,2
Controle positivo	montelukast (30 mg/ml)	22,3±7,2	466,0±207,0

NEU: neutrófilo; EOS: eosinófilo

[00144] Como mostrado na Tabela 18 acima, o grupo que recebe os materiais dos Exemplos 2-7 tem contagem mais baixa de células brancas do sangue relativas à inflamação (neutrófilo, eosinófilo) do que o grupo que recebe o extrato de folha de hera só e o grupo que recebe a droga de controle positivo.

4) Observação do Tecido Pulmonar

[00145] Os graus de oclusão de bronquíolos e a infiltração de células inflamatórias de montelukast usado como droga de controle positivo, extrato de folha de hera e os extratos combinados dos Exemplos 2-7 de acordo com as concentrações são apresentados na Tabela 19 seguinte e as fotografias do tecido pulmonar corado por H & E são mostradas na Figura 5. ((a) Grupo normal, (b) grupo induzido, (c) grupo de controle positivo, (d) Exemplos 2-7). Na Tabela 19 seguinte, 1=Não, 2=leve, 3=fino, 4=moderado, 5=espesso de acordo com os graus de oclusão e infiltração da células inflamatórias.

Tabela 19

		Observação ao microscópio	
		Grau de oclusão dos brônquios	Grau de infiltração das células inflamatórias
Grupo normal		0±0	0±0
Grupo induzido		3,3±0,5	3,8±0,4
Exemplos 2-7 (200 mg/kg)		1,8±0,4	1,9±0,4
Extrato de folha de hera (200 mg/kg)		2,0±0,0	2,3±0,5
Controle positivo	montelukast (30 mg/ml)	3,5±0,5	3,7±0,5

[00146] Como mostrado na Tabela 19 acima, os extratos combinados dos Exemplos 2-7 exibem efeito de maior excelência para suprimir a oclusão dos brônquios e a infiltração de células inflamatórias do que o extrato de folha de hera e a droga de controle positivo.

5) RT-PCR

[00147] As taxas de expressão das citocinas que medeiam a inflamação (IL-1 β , IL-4, IL-13r2a) de montelukast usado como droga de controle positivo e os materiais do experimento dos Exemplos 2-7 de acordo com as concentrações são apresentadas na Tabela 20 seguinte. Na Tabela 20, cada valor é obtido dividindo a densidade de cada citocina de acordo com a irradiação de UV pela densidade da actina.

Tabela 20

		Grau de expressão da citocina		
		IL-1 β	IL-4	IL-13r2a
Grupo normal		0,58 $\pm$ 0,27	0,58 $\pm$ 0,21	0,56 $\pm$ 0,49
Grupo induzido		0,94 $\pm$ 0,39	1,96 $\pm$ 0,98	0,20 $\pm$ 0,67
Exemplos 2-7 (200 mg/kg)		0,16 $\pm$ 0,74	0,83 $\pm$ 0,67	0,29 $\pm$ 0,96
Extrato de folha de hera (200 mg/kg)		1,21 $\pm$ 0,62	0,14 $\pm$ 0,70	0,60 $\pm$ 0,70
Controle positivo	montelukast (30 mg/ml)	0,51 $\pm$ 0,26	1,47 $\pm$ 0,48	0,37 $\pm$ 0,31

[00148] Como mostrado na Tabela 20 acima, no grupo que recebe os materiais dos Exemplos 2-7, a expressão das citocinas que medeiam a inflamação (IL-1 β , IL-4, IL-13r2a) está mais suprimida em comparação com o grupo que recebe o extrato de folha de hera só e o grupo que recebe a droga de controle positivo.

Exemplo 5. Formulação do Extrato de Coptidis Rhizoma

5-1 - Preparação do Pó

extrato de Coptidis Rhizoma (Exemplo 1-1) 20 mg

lactose 100 mg

talco 10 mg

[00149] Os ingredientes acima foram misturados e enchidos num saco fechado hermeticamente para preparar um pó.

5-2. Preparação de Tablete

extrato de Coptidis Rhizoma (Exemplo 1-2)	10 mg
farinha de milho	100 mg
lactose	100 mg
estearato de magnésio	2 mg

[00150] Os ingredientes acima foram misturados e comprimidos pelo método comum de preparação de tablete para preparar um tablete.

5-3 - Preparação de Cápsula

extrato de Coptidis Rhizoma (Exemplo 1-3)	10 mg
celulose cristalina	3 mg
lactose	14.8 mg
estearato de magnésio	0,2 mg

[00151] Os ingredientes acima foram misturados pelo método comum de preparação de cápsulas e enchidos numa cápsula de gelatina para preparar uma cápsula.

5-4 - Preparação de Injeção

extrato de Coptidis Rhizoma (Exemplo 1-4)	10 mg
manitol	180 mg
água estéril para injeção	2974 mg
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	26 mg

[00152] Uma ampola (2 m℥) foi preparada com o conteúdo dos ingredientes acima pelo método comum de preparação de injeção.

5-5 - Preparação de Solução

extrato de Coptidis Rhizoma (Exemplo 1 - 1)	20 mg
--	-------

xarope de milho de frutose elevada	10 g
manitol	5 g
água purificada	quantidade apropriada

[00153] De acordo com método comum de preparação de solução, cada ingrediente foi adicionado à água purificada e nela dissolvido e limão foi-lhe adicionado numa quantidade apropriada. E, então, os ingredientes acima foram misturados e água purificada adicionada a isso de forma que a quantidade total se tornasse de 100 mL e enchido numa garrafa marrom e esterilizado para preparar uma solução.

5-6 - Preparação de Alimento de Saúde

extrato de Coptidis Rhizoma (Exemplo 1-2)	1.000 mg
acetato de vitamina A	70 µg
vitamina E	1,0 mg
vitamina B1	0.13 mg
vitamina B2	0,15 mg
vitamina B6	0,5 mg
vitamina B12	0.2 µg
vitamina C	10 mg
biotina	10 µg
amida do ácido nicotínico	1,7 mg
ácido fólico	50 µg
pantotenato de cálcio	0,5 mg
mistura mineral	quantidade apropriada

sulfato ferroso	1,75 mg
óxido de zinco	0,82 mg
carbonato de magnésio	25,3 mg
fosfato de potássio monobásico	15 mg
fosfato de cálcio dibásico	55 mg
citrato de potássio	90 mg
carbonato de cálcio	100 mg
cloreto de magnésio	24,8 mg

[00154] As relações acima de vitaminas e misturas minerais ilustram um exemplo preferível de misturar ingredientes relativamente apropriados para um alimento de saúde; porém, as relações podem ser modificadas. E os ingredientes acima podem ser misturados de acordo com um método comum de preparação de alimentos de saúde e, então, feitos em grânulos e usados para a preparação de uma composição de alimento de saúde pelo método comum.

5-7 - Preparação de Bebida de Saúde

extrato de Coptidis Rhizoma (Exemplo 1-3)	1.000 mg
ácido cítrico	1.000 mg
oligossacarídeo	100 g
concentrado de albricoque japonês	2 g
taurin	1 g

[00155] água purificada adicionada de modo alcançar uma quantidade total de 900 mL.

[00156] Os ingredientes acima foram misturados de acordo com um

método comum de preparação de bebida de saúde e aquecidos com agitação a 85°C durante mais ou menos 1 hora e, então, a solução preparada foi filtrada para coletar num vaso esterilizado de 2 L, vedado com esterilização e armazenado com refrigeração.

[00157] As relações acima ilustram um exemplo preferível de misturar ingredientes relativamente apropriados numa bebida favorita; porém, podem ser modificadas de acordo com os sabores étnicos e regionais tais como classe de demanda, país de demanda, uso etc.

Exemplo 6 Formulação de Extrato Combinado de Coptidis Rhizoma com Folha de Hera

6-1 - Preparação de Tablete

[00158] 200 mg do extrato combinado do Exemplo 2-7, 10 mg de ácido silícico anidro leve, 2 mg de estearato de magnésio, 50 mg de celulose microcristalina, 25 mg de ácido glicólico amido sódio, 113 mg de farinha de milho e uma quantidade apropriada de etanol anidro foram misturados e comprimidos num tablete por um método comum.

6-2 - Preparação de Alimento de Saúde

extrato combinado (Exemplo 2-7)	1.000mg
acetato de vitamina A	70 µg
vitamina E	1,0
vitamina B1	0,13
vitamina B2	0,15
vitamina B6	0,5 mg
vitamina B12	0,2 µg
vitamina C	10 mg

biotina	10 µg
amida do ácido nicotínico	1,7 mg
ácido fólico	50 µg
pantotenato de cálcio	0, 5 mg
mistura mineral	quantidade apropriada
sulfato ferroso	1,75 mg
óxido de zinco	0,82 mg
carbonato de magnésio	25,3 mg
fosfato de potássio monobásico	15 mg
fosfato de cálcio dibásico	55 mg
citrato de potássio	90 mg
carbonato de cálcio	100 mg
cloreto de magnésio	24,8 mg

[00159] As relações acima de vitamina e misturas minerais ilustram um exemplo preferível relativamente apropriado de misturar ingredientes para um alimento de saúde; porém, as relações podem ser modificadas. E os ingredientes acima podem ser misturados por um método comum de preparação de alimento de saúde, feito em grânulos e usado para a preparação de alimento de saúde por um método comum.

6-3 - Preparação de Bebida de Saúde

extrato combinado (Exemplo 2-7)	1.000 mg
ácido cítrico	1.000 mg
oligossacarídeo	100 g

concentrado de albricoque japonês 2 g

taurin	1 g
--------	-----

água purificada adicionada até alcançar uma quantidade total de 900 mL.

[00160] Os ingredientes acima foram misturados por um método comum de preparação de bebida de saúde e, então, aquecidos com agitação a 85°C durante mais ou menos 1 hora e, então, a solução obtida foi filtrada e introduzida num vaso esterilizado de 2L e vedada com esterilização e, então, armazenada sob refrigeração.

[00161] As relações acima ilustram um exemplo preferível relativamente apropriado de misturar ingredientes para uma bebida de saúde; porém, as relações podem ser modificadas de acordo com o gosto regional e étnico tal como classe de demanda, país de demanda, uso etc.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição Antitússica ou Expectorante para Prevenção ou Tratamento de Doença Respiratória, caracterizada por que a composição compreende uma combinação de extrato de rizoma de *Coptidis* e um extrato de folha de hera como ingrediente ativo e a composição está na forma de um extrato combinado de rizoma de *Coptidis* e folha de hera e em que a relação de peso do extrato de folha de hera e o extrato de rizoma de *Coptidis* é de 0,1 :1 a 10:1 (peso de extrato de folha de hera: peso do extrato de rizoma de *Coptidis*) e em que o extrato é um extrato cru que é obtido usando um ou mais solventes selecionados a partir do grupo que consiste em água e álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 4 carbonos como solvente de extração ou um extrato solvente-solúvel que é obtido adicionando uma solução aquosa de álcool linear ou ramificado tendo de 1 a 6 carbonos para o extrato cru.

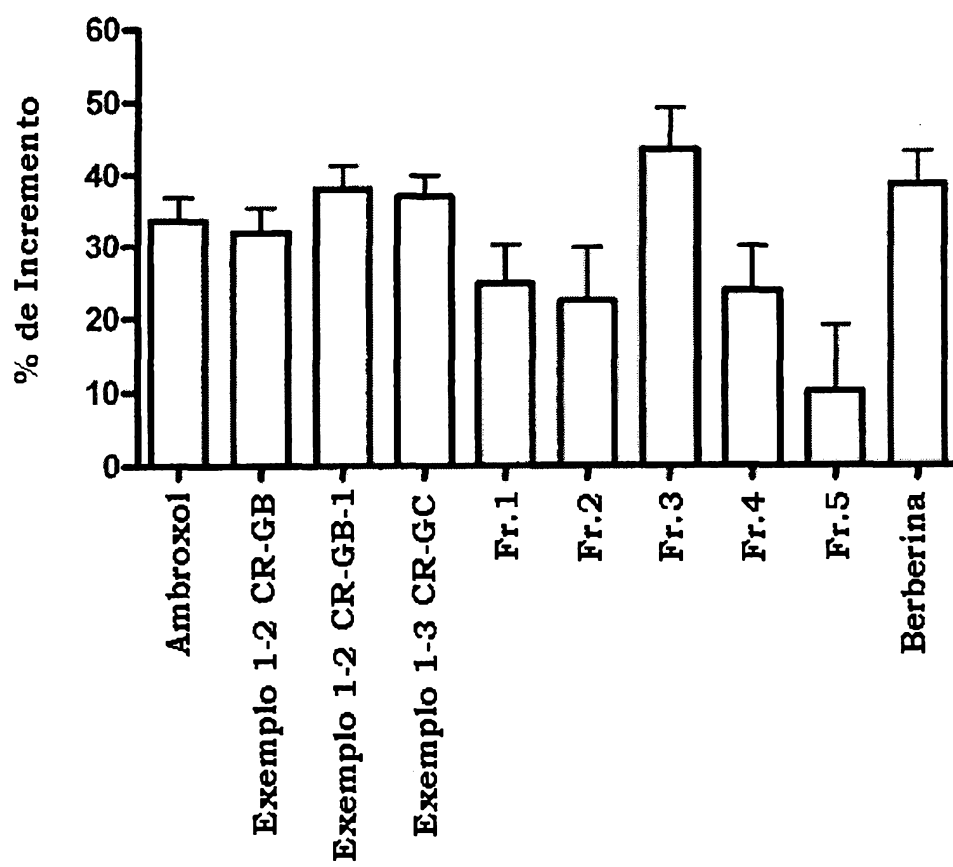
2. Composição Antitússica ou Expectorante para Prevenção ou Tratamento de Doença Respiratória, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada** por que a relação de peso do extrato de folha de hera e o extrato de rizoma de *Coptidis* é de 0,2:1 a 5:1 (peso de extrato de folha de hera: peso do extrato de rizoma de *Coptidis*).

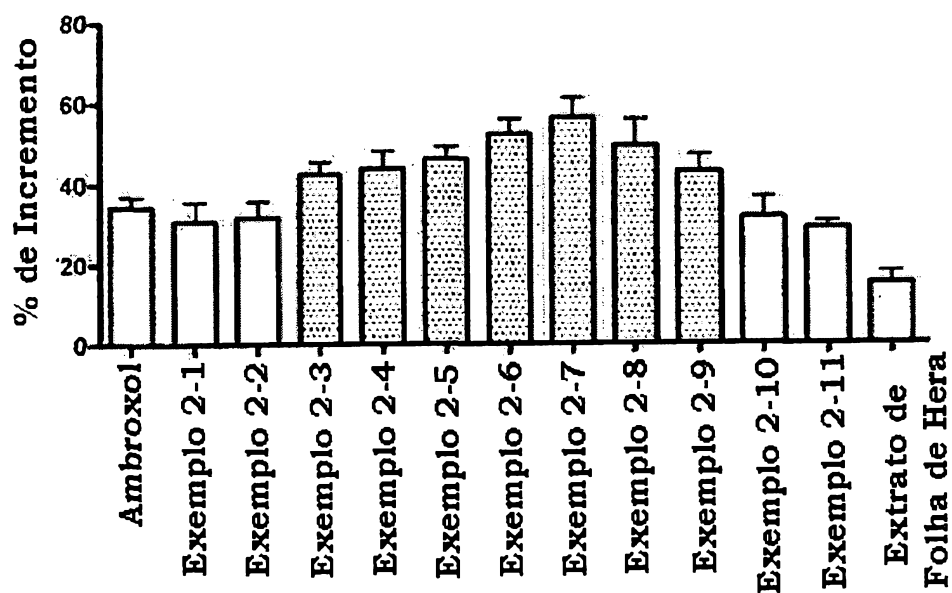
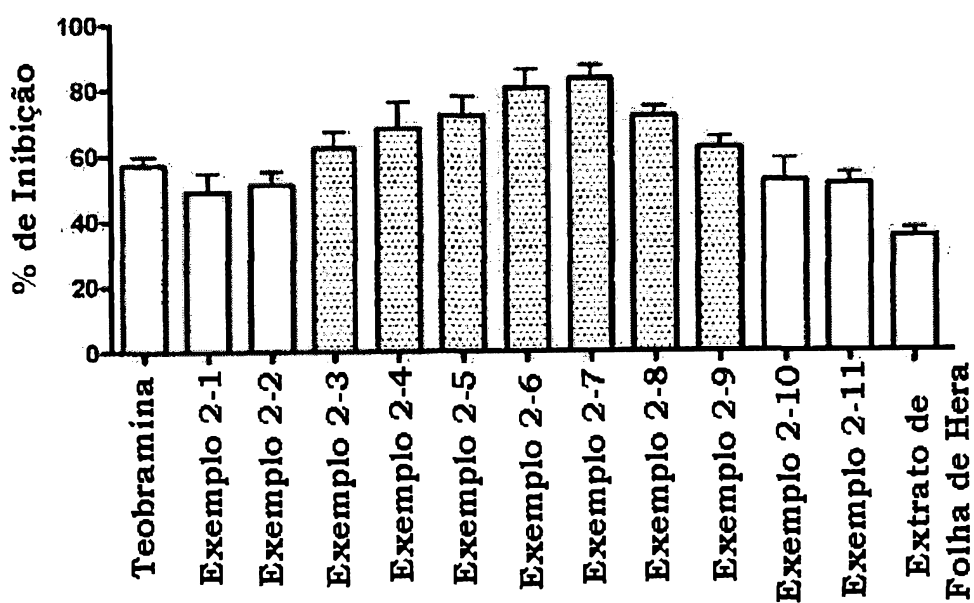
3. Composição Antitússica ou Expectorante para Prevenção ou Tratamento de Doença Respiratória, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 2, **caracterizada** por que a doença respiratória é selecionada a partir do grupo que consiste em enfisema pulmonar, bronquite, asma, bronco-constricção crônica ou aguda, síndrome do estrídulo infantil, doença pulmonar obstrutiva crônica, adenoma brônquico, nódulo pulmonar solitário, tuberculose pulmonar, piotórax, abscesso pulmonar, resfriado comum, gripe, e histiocitose pulmonar.

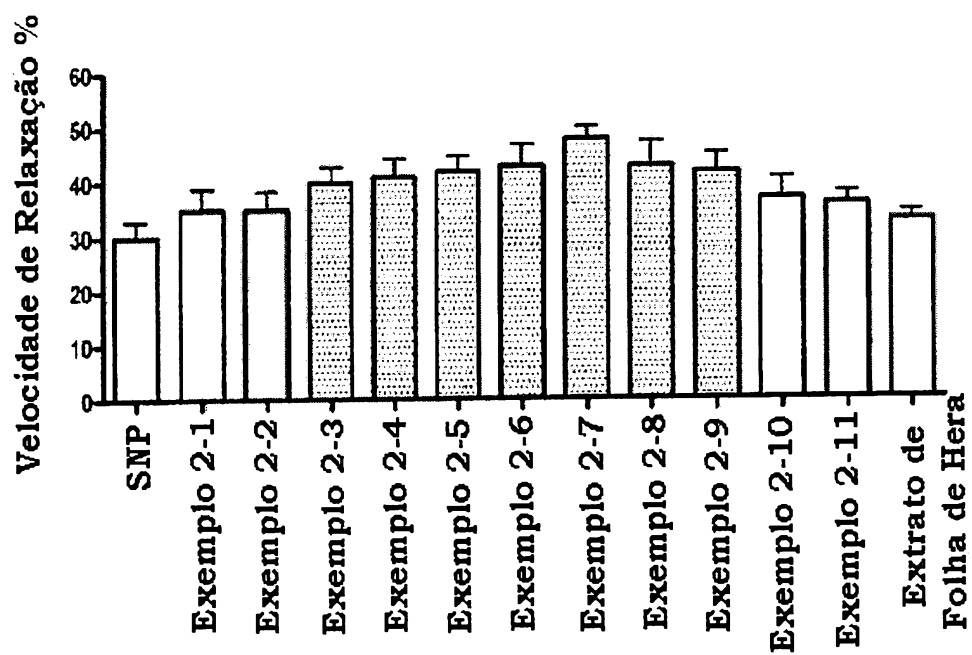
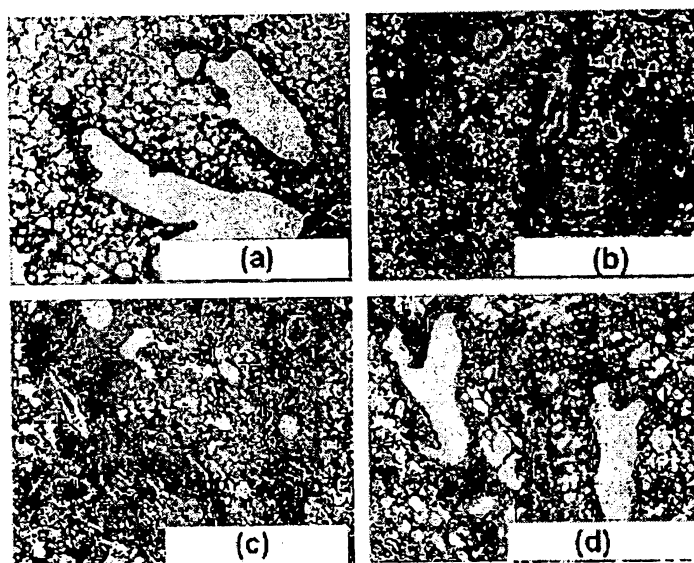
4. Composição Antitússica ou Expectorante para Prevenção ou Tratamento de Doença Respiratória, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 3, **caracterizada** por que a composição é

formulada em pó, grânulo, tablete, cápsula, suspensão, emulsão, xarope, aerossol, agente transdérmico, supositório ou solução de injeção estéril.

5. Alimento Funcional Para a Saúde, para prevenir ou melhorar uma doença respiratória, **caracterizado** por que compreende a composição de qualquer uma das Reivindicações de 1 a 4.

**Figura 1**

**Figura 2****Figura 3**

**Figura 4****Figura 5**