

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 792**

51 Int. Cl.:

A61K 36/488 (2006.01)

A61K 35/64 (2006.01)

A61K 36/25 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06715790 .9**

96 Fecha de presentación: **31.01.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1846106**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.10.2007**

54 Título: **Composición farmacéutica para tratar la nefropatía y alimento sano que comprende extractos de hierbas**

30 Prioridad:

31.01.2005 KR 20050008649

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

28.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

28.12.2012

73 Titular/es:

**DONG WHA PHARM. CO., LTD. (100.0%)
5 SOONWHA-DONG
JOONG-KU SEOUL, KR**

72 Inventor/es:

**RYU, JEI-MAN;
LEEM, MOON-JUNG;
ROH, YANG-KOOK;
CHANG, HWAN-BONG;
OH, SEONG-JUN;
LEE, HYUN-YONG;
KU, SAE-KWANG;
YANG, HEE-BOG;
RHEE, JUNG-WOO;
KIM, YUN-JUNG y
YOON, JOO-BYOUNG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 393 792 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para tratar la nefropatía y alimento sano que comprende extractos de hierbas

5 Campo técnico

Esta invención se refiere a un nuevo uso de un extracto de hierbas para la prevención y el tratamiento de la insuficiencia renal, en el que comprende medicinas de hierbas seleccionadas del grupo que consiste en Puerariae Radix y Mori Cortex.

10 Por lo tanto, el extracto de hierbas de esta invención se puede usar de manera eficaz como una composición farmacéutica o un alimento sano para prevenir y tratar la insuficiencia renal, es decir el fallo renal.

15 Antecedentes

Los mamíferos tienen dos riñones, uno en cada lado de la región de la mitad inferior de la espalda. Cada riñón consta de aproximadamente 1 millón de nefronas. Una nefrona consta de un corpúsculo renal y un túbulo renal especializado para reabsorción y excreción.

20 La insuficiencia renal da como resultado el daño a las nefronas, produciendo que no funcionen adecuadamente. El fallo renal se puede dividir en agudo (un comienzo rápido) o crónico (progresivo lentamente con el tiempo).

25 Dependiendo de las causas, una serie de diferentes enfermedades (por ejemplo, glomerulonefritis o neuropatía diabética asociada con complicaciones diabéticas o hipertensivas) puede dar como resultado insuficiencia renal. Puede ser el resultado directo de una infección o un fármaco tóxico para los riñones.

30 El fallo renal crónico se define como daño a los riñones o velocidad de filtración glomerular menor que 50%. Con independencia de la agresión inicial, este es invariablemente un procedimiento progresivo que da como resultado insuficiencia renal terminal (ESRD, por sus siglas en inglés). Con los años, la ESRD puede ser una enfermedad potencialmente mortal causada por otras complicaciones en la sangre, el sistema nervioso, el sistema gastrointestinal y el sistema inmunitario así como por infección u osteodistrofia.

35 El número de pacientes con insuficiencia renal está creciendo en el mundo, pero los síntomas con frecuencia no son evidentes hasta que el fallo renal está avanzado. En Corea, hay aproximadamente 450.000 personas con fallo renal y es probable que aumente más un total de pacientes incluyendo los que se han diagnosticado temprano.

40 Después de que se produce la ESRD, se requiere tratamiento de sustitución renal, en la forma de diálisis o trasplante. Sin embargo, su amplio uso está restringido debido al fracaso en el tratamiento de la causa subyacente del fallo renal crónico en fase temprana y media y mayores costes médicos que son gravosos para los pacientes y los miembros de sus familias.

45 Recientemente, muchos investigadores en su país y en otros han realizado intensos estudios sobre el mecanismo de las funciones renales alteradas y como resultado, algunos compuestos con estructuras químicas simples se han hecho disponibles como medio para controlar la presión sanguínea y tratar la enfermedad original, siempre que sea factible. Por ejemplo, se usan inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE, por sus siglas en inglés), ya que se ha encontrado que retardan la evolución de la ESRD. Normalmente es necesaria la sustitución del factor estimulador de la eritropoyesis (ESF, por sus siglas en inglés) y vitamina D₃ activada, dos hormonas procesadas por el riñón. Sin embargo, el amplio uso de estos fármacos ha estado bastante restringido debido a mayores costes de los fármacos y al tratamiento paliativo. En este contexto, hay una necesidad urgente del desarrollo de nuevos fármacos para tratamiento de la insuficiencia renal en el sector farmacéutico.

50 El reciente desarrollo de fármacos se ha centrado en plataformas químicas que han derivado de fuentes naturales. Con una combinación de nuevas propiedades, estructura y menos toxicidad, es lo más probable que los productos naturales en la actualidad continúen existiendo y creciendo para llegar a ser incluso más valiosos como fuentes de nuevos ejemplos de fármacos.

55 Manteniéndose al corriente de las tendencias actuales del desarrollo de fármacos, los autores han ensayado una serie de medicinas de hierbas para asegurar que son eficaces para mejorar la función renal en pacientes con fallo renal.

60 Puerariae Radix, que pertenece a Leguminosae, una raíz en la que se elimina la peridermis de Pueraria thunbergiana. Se ha demostrado que esta planta posee propiedades reductoras de lípidos (Modern Chinese Medicines and Clinical Application, 626-632, 1.994) y antidiabéticas (Anti-senility Chinese Medicine and Pharmacology, 186-187, 1.989).

65

Los autores han procurado investigar una amplia variedad de medicinas de hierbas prometedoras y alimentos sanos enumerados en el Código Estándar de Alimentación Coreano para encontrar un potencial para la prevención y el tratamiento de la insuficiencia renal. Como consecuencia los autores han descubierto que Puerariae Radix y Mori Cortex pueden ser útiles para la mejora de las funciones renales y consumaron esta invención.

- 5 Descripción de la invención
- Problema técnico
- 10 El objeto de esta invención es proporcionar nuevos candidatos farmacéuticos y alimentos sanos para prevenir y tratar insuficiencias renales, que se seleccionan de medicinas de hierbas enumeradas en el Código Estándar de Alimentación Coreano.
- Solución técnica
- 15 Esta invención es para proporcionar una composición farmacéutica para uso en la prevención y/o el tratamiento de fallo renal que comprende extractos de hierbas seleccionadas de Puerariae radix y Mori cortex en una relación en peso de 3:1 a 1:3, en la que los extractos de hierbas se pueden obtener por adición de agua a cada uno de Puerariae radix y Mori cortex en una relación en peso de 6:1, extracción con agua hirviendo durante dos horas y filtración para obtener el primer extracto en la ebullición, adición de agua adicional al residuo en una relación en peso de 6:1, extracción con agua hirviendo durante una hora y filtración para obtener el segundo extracto en el agua hirviendo, proporcionando una mezcla de los dos extractos en el agua hirviendo, liofilización de la mezcla de los dos extractos en el agua hirviendo para obtener un solo extracto en forma de polvo.
- 20
- 25 Esta invención se describe con más detalle como se explica en lo sucesivo.
- Esta invención contiene extractos de medicinas seleccionados del grupo que consiste en Puerariae Radix y Mori Cortex.
- 30 Los extractos de hierbas de esta invención han demostrado su eficacia para el tratamiento de la insuficiencia renal en modelos animales vía mediciones de niveles de nitrógeno en urea en sangre (BUN, por sus siglas en inglés), niveles de creatinina en sangre, células tubulares necróticas y células glomerulares degeneradas.
- 35 El BUN mide la cantidad de nitrógeno en urea, un producto de desecho del metabolismo de las proteínas, en la sangre y la creatinina es una molécula de desecho químico que se genera en el metabolismo de los músculos. El BUN y la creatinina son transportados por el torrente sanguíneo a los riñones. Los riñones filtran BUN y creatinina y los disponen en la orina.
- 40 Cuando los riñones llegan a dañarse, los niveles de BUN y creatinina en la sangre aumentarán. Por lo tanto, se ha encontrado que el BUN y la creatinina en suero son indicadores bastante fiables que pueden evaluar la eficacia de los fármacos en modelos animales con fallo renal (Arch Med Res. noviembre-diciembre de 2.004; 35 (6): 484-94).
- 45 Una nefrona es la unidad estructural y funcional básica del riñón. A medida que disminuye el número de nefronas, la función renal empieza a empeorar. A medida que progresa la nefropatía diabética, se destruyen números crecientes de glomérulos. La función de filtración de la sangre afectada en los glomérulos puede dar como resultado la degeneración glomerular. Por lo tanto, se usan células tubulares necróticas y células glomerulares degeneradas como marcadores importantes de la insuficiencia renal.
- 50 Como resultado de medir los niveles de BUN y creatinina en la sangre, las células glomerulares degeneradas y las células tubulares necróticas son marcadores importantes de la insuficiencia renal, los extractos de hierbas de Puerariae Radix son más eficaces que el extracto de Mori Cortex en la mejora de la función renal, aunque Mori Cortex tiene una acción diurética. Cuando se aplica la misma cantidad, el extracto de hierbas mezclado ha demostrado mejores efectos que un solo extracto de hierbas, junto con efectos sinérgicos.
- 55 Por lo tanto, los extractos de hierbas de esta invención se pueden usar con eficacia como una composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de la insuficiencia renal, es decir fallo renal, causada por una serie de diferentes enfermedades, tales como diabetes, hipertensión arterial, glomerulonefritis, toxicidad de fármacos (por ejemplo, antibióticos) e infección urinaria.
- 60 Los extractos de hierbas de esta invención se pueden extraer de Puerariae Radix comercialmente disponible de tal manera que se añada agua a la medicina de hierbas en una relación en peso de 6 a 1.
- Los extractos de hierbas de esta invención incorporan además el extracto de Mori Cortex para una mejor gestión de la función renal alterada.

El extracto de Mori Cortex ha demostrado poseer una acción diurética (YAKHAK HOEJI 26 (4), 197-128 (1.982)), pero la eficacia de este extracto para el fallo renal aún se tiene que elucidar.

5 Los extractos de hierbas de esta invención se pueden preparar como extracto suave a presión reducida a 60-70°C o como forma de polvo seco por liofilización o usando secador de atomización o máquina de lecho fluidizado.

10 La composición farmacéutica para uso en esta invención puede presentar rutas convenientes de administración, tales como forma oral, parenteral, dental, sublingual, nasal, rectal o subcutánea. La composición farmacéutica de esta invención puede contener portadores fisiológicamente aceptables para cada forma farmacéutica.

15 Para gente sana (peso corporal estándar; 60 kg) la composición farmacéutica de esta invención se puede administrar en una dosis de 10-1.000 mg/día en 1-3 dosis divididas. La dosificación y la administración pueden variar dependiendo de la edad, la importancia de la enfermedad y la categoría terapéutica.

20 Los extractos de hierbas usados en esta invención se pueden usar como alimento sano para mejorar la función renal. Además de los extractos de hierbas mencionados, el alimento sano de esta invención puede incluir sustancias usadas comúnmente en una forma única o mezclada en el sector de los alimentos sanos; nutrientes (vitamina, aminoácido, anti-oxidante), modificador del pH (ácido cítrico, citrato de sodio), edulcorantes (glucosa líquida, eritritol, paratinosa), aromatizantes artificiales, agentes colorantes, excipientes (lactosa, glucosa, almidón, lactulosa), estabilizantes, lubricantes (estearato de magnesio), cremas (aceite de germen de trigo, aceite de oliva, cera de abejas, cera, tocoferol).

25 El alimento sano de esta invención se puede preparar en una amplia variedad de formas farmacéuticas orales, tales como bebidas, comprimidos, píldoras, cápsulas duras/blandas y gránulos, usando aditivos aceptables en el sector relacionado.

Efectos ventajosos

30 Esta invención es para proporcionar una composición farmacéutica para uso en la prevención y/o el tratamiento de fallo renal que comprende extractos de hierbas seleccionadas del grupo que consiste en Puerariae Radix y Mori Cortex. Estos extractos de hierbas pueden desempeñar un papel para reducir los niveles de BUN y creatinina en sangre, células tubulares necróticas y células glomerulares degeneradas, proporcionando así un nuevo candidato farmacéutico útil para la prevención y el tratamiento de la insuficiencia renal, es decir fallo renal.

35 Así los extractos de hierbas de esta invención se pueden emplear de manera eficaz como composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de la insuficiencia renal, es decir fallo renal.

Breve descripción de los dibujos

40 La Fig. 1 es una micrografía de ensayo histopatológico de riñón.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

45 Esta invención se describirá ahora como referencia a los siguientes ejemplos y ejemplos experimentales que son simplemente ilustrativos y que no se tienen que interpretar como una limitación del alcance de esta invención.

Ejemplo 1: Preparación de extractos únicos de Puerariae Radix y Mori Cortex

50 Se adquirieron Puerariae Radix y Mori Cortex del mercado y se evaluaron por la Farmacopea Coreana (la 8ª edición revisada). Se añadió agua a cada una de Puerariae Radix y Mori Cortex, que se encontraron que se ajustaban a los estándares actuales, en una relación en peso (6: 1), se extrajeron con agua hirviendo durante 2 horas y se filtraron para obtener el primer extracto en agua hirviendo.

55 Se añadió además agua al residuo en una relación en peso (6: 1), se extrajo con agua hirviendo durante 1 hora y se filtró para obtener el segundo extracto en agua hirviendo. Se liofilizó una mezcla de los dos extractos en agua hirviendo para obtener un solo extracto de las cuatro hierbas en forma de polvo.

Ejemplo 2-4: Preparación de un extracto mezclado que contiene el extracto de dos hierbas seleccionadas de Puerariae Radix y Mori Cortex

60 Como se muestra en la Tabla 1, se preparó un total de 3 extractos en polvo que contenían dos extractos de hierbas seleccionados de extractos únicos de Puerariae Radix y Mori Cortex, así obtenidos en el Ejemplo 1, en diferentes relaciones en peso.

Tabla 1

Tres extractos de polvo que contenían dos extractos de hierbas en diferentes relaciones en peso

		Puerariae Radix	Mori Cortex
Ejemplo 2		1	1
Ejemplo 3		3	1
Ejemplo 4		1	3

5 Ejemplo experimental 1: Medición de niveles de BUN en animales con diabetes inducida.

Debido a que los riñones liberan urea del torrente circulatorio, se puede usar un ensayo que mide cuanto nitrógeno en urea permanece en la sangre como un ensayo de función renal. Así, los autores midieron los niveles de BUN en animales con diabetes inducida que habían recibido un solo extracto o un extracto mezclado.

10

1. Medición de niveles de BUN en grupos tratados con un solo extracto.

Se usaron extractos únicos preparados a partir del Ejemplo 1 como muestras de ensayo.

15

Se distribuyeron de manera aleatoria ratas SD hembras de seis semanas en seis grupos (cinco animales por grupo); 1) un grupo normal, 2) un grupo de control diabético inducido con estreptozotocina sin tratamiento y cuatro grupos diabéticos inducidos con estreptozotocina que recibieron 200 mg/ kg de cada muestra de ensayo. Se indujo diabetes en las ratas por administración intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg de peso corporal). Se recogieron dos muestras de sangre a los 3 días después de la inyección de estreptozotocina y a los 28 días después de tratamiento con cada una de las muestras de ensayo. Se determinó el nivel de glucosa en sangre usando un tubo al vacío de glucosa de NaF y un analizador de sangre. También se realizaron mediciones del nivel de BUN con un analizador de sangre en suero. Se realizó el análisis de suero por el centro clínico E-won situado en Dongjak-gu, Seúl, Corea.

20

25

Como se muestra en la Tabla 2, los niveles de BUN en ratas tratadas con extracto y control fueron elevados, cuando se compara con ratas normales. Sin embargo, se observaron disminuciones significativas en los niveles de BUN de animales que recibieron Puerariae Radix y Mori Cortex, comparado con niveles en control. En particular, se observaron más disminuciones en los niveles de BUN en ratas tratadas con extractos de Puerariae Radix que con extracto de Mori Cortex.

30 Tabla 2

Niveles de BUN (mg/dl, media \pm D. E.)

	Niveles de BUN
Normal	19,43 \pm 0,83
Control	112,17 \pm 6,88*
Extracto de Puerariae Radix	80,23 \pm 6,73*#
Extracto de Mori Cortex	84,43 \pm 27,66*#

#P<0,05 (comparado con ratas normales). *P<0,05 (comparado con ratas de control)

35 Ejemplo experimental 2: Medición de células tubulares necróticas en ratas con diabetes inducida

Se realizaron mediciones de células tubulares necróticas para valorar la eficacia de extractos de hierbas de esta invención contra la insuficiencia renal.

40 1. Materiales y Métodos

Se proporcionan muestras de ensayo (Ejemplo 1) a ratas (Ejemplo experimental 1) a la dosis de 200 mg/kg. Las células tubulares necróticas se midieron usando un analizador de imagen.

45 2. Resultados

Como se muestra en la Tabla 4, se observó que el número de células tubulares necróticas en todas las ratas tratadas con extracto era inferior (8 veces) que el de control. Entre las dos ratas tratadas con un solo extracto, el efecto inhibitorio mayor sobre las células tubulares necróticas se detectó en ratas tratadas con extracto de Puerariae Radix.

50

Tabla 4

Células tubulares necróticas (Células muertas/1.000 células tubulares, media \pm D. E.)

Grupo	Células tubulares necróticas
Normal	1,17±0,75
Control	480,67±122,38*
Extracto de Puerariae Radix	169,33±39,15* [#]
Extracto de Mori Cortex	320,17±72,08* [#]

*P<0,05 (comparado con grupo normal), [#]P<0,01/^{##}P<0,05 (comparado con grupo de control)

Ejemplo experimental 3: Medición de células glomerulares degeneradas en ratas con diabetes inducida

- 5 Se realizaron mediciones de células glomerulares degeneradas para evaluar la eficacia de extractos de hierbas de esta invención contra la insuficiencia renal.

1. Materiales y Métodos

- 10 Usando las mismas muestras de ensayo y animales que los del Ejemplo experimental 2, se calculó el número de células glomerulares degeneradas en los riñones usando un analizador de imagen.

2. Resultados

- 15 Como se muestra en la Tabla 5, se observó un incremento significativo en el número de células glomerulares degeneradas en ratas de control tratadas con estreptozotocina, cuando se compara con ratas normales. Hubo una reducción significativa de células glomerulares degeneradas diabéticas en las ratas tratadas con un solo extracto de Puerariae Radix y Mori Cortex en comparación con ratas de control. El número decreciente de células glomerulares degeneradas se observó notoriamente en ratas tratadas con el extracto de Puerariae Radix en comparación con ratas tratadas con extracto de Mori Cortex.

Tabla 5

Número de células glomerulares degeneradas (media ± D. E.)

	Número de células glomerulares degeneradas
Normal	1,83±0,75
Control	79,17±10,40*
Extracto de Puerariae Radix	54,50±12,11* [#]
Extracto de Mori Cortex	65,17±8,91* [#]

- 25 *P<0,05 (comparado con grupo normal), [#]P<0,01/^{##}P<0,05 (comparado con grupo de control)

Ejemplo experimental 4: Ensayo histopatológico en ratas con diabetes inducida

- 30 La degeneración y la fibrosis detectadas en el riñón se pueden usar como marcadores de insuficiencia renal (J Pathol., marzo de 2.000; 190 (4): 484-8). Así, se realizó el ensayo histopatológico en tejidos renales para evaluar la eficacia de los extractos de hierbas de esta invención contra la insuficiencia renal.

1. Materiales y Métodos

- 35 Se usaron las mismas muestras de ensayo y animales que los del Ejemplo experimental 1 para este experimento.

- 40 28 días después de la dosificación de las muestras de ensayo, se tuvieron en ayunas durante la noche ratas SD hembras y se sacrificaron por exsanguinaciones de la vena cava. Los riñones diseccionados se fijaron en formalina al 10% y se embebieron en parafina. La sección se cortó en espesores de 3-4 m y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

2. Resultados

- 45 A medida que progresa la nefropatía debido a células glomerulares degeneradas y necrosis tubular, los cambios parenquimales asociados a la fibrosis en el sitio afectado pueden conducir a fallo renal crónico. En este contexto, la fibrosis renal llega a ser un marcador importante para el fallo renal crónico.

- 50 Como se muestra en la Fig. 1 y la Tabla 6, existió fibrosis renal leve en todos los grupos tratados con extracto por menos de 40 por ciento en comparación con todas las ratas de control. El número de células degeneradas disminuyó de manera significativa en todas las ratas tratadas con extracto por aproximadamente 1/3 a 1/5, cuando se compara con control. Por lo tanto, se observa esa elevación evitada de manera significativa en la fibrosis renal y se observó la célula degenerada en los grupos de ensayo, cuando se compara con el grupo de control.

Tabla 6

Resultados de ensayo histopatológico

Categoría	Normal	Control	Grupos de ensayo		
			100 mg/kg	200 mg/kg	300 mg/kg
Fibrosis Renal	0/5 (0%)	5/5 (100%)	2/5 (40%)	1/4 (25%)	1/5 (20%)
1 +	0/5 (0%)	3/5 (60%)	2/5 (40%)	1/4 (25%)	1/5 (20%)
2+	0/5 (0%)	2/5 (40%)	0/5 (0%)	0/4 (0%)	0/5 (0%)
Cambio del número de células degeneradas	1,40± 1,14	346,60± 68,23*	123,00± 21,21*	87,40± 30,05* [#]	66,80± 30,13* [#]

Grados de observaciones totales, 1+: Aspecto ligero; +2: Aspecto moderado.

5

Ejemplo experimental 5: Medición de los niveles de BUN en ratas con fallo renal agudo

Los extractos mezclados, así preparados en los Ejemplos 2-4, se usaron como muestras de ensayo.

10 Se distribuyeron de manera aleatoria ratas SD hembras de seis semanas en 13 grupos (cinco animales por grupo); 1) un grupo normal, 2) un grupo de control que mostraba fallo renal agudo inducido por cisplatino (CCDP), 3) grupo de 100 mg/kg de captopril (CAPT) como control positivo y 4) tres grupos que mostraban fallo renal agudo inducido por CCDP y tratados con 200 mg/kg de los extractos (Ejemplos 2- 4).

15 Se administraron por vía oral muestras de ensayo a animales a la dosis de 200 mg/kg en un periodo que osciló de 23 días antes de administración de CCDP a 4 días después de administración de CCDP. Cinco días después de administración de CCDP, se sacrificaron todos los animales para evaluar los niveles de BUN.

20 Los resultados del ensayo se compararon con dos grupos de control positivos. Como se muestra en la Tabla 13, los niveles de BUN en ratas de control tratadas con vehículo fueron significativamente mayores ($p < 0,01$) que los de ratas normales. Sin embargo, los niveles de BUN en todas las ratas tratadas con fármaco fueron significativamente menores ($p < 0,01$ o $p < 0,05$) que los de ratas de control tratadas con vehículo.

25 Se observó que la elevación de los niveles de BUN en ratas con fallo renal agudo inducido por CCDP se prevenía notoriamente mediante el extracto del Ejemplo 2 (Puerariae Radix:Mori Cortex= 1:1).

Tabla 13

Mediciones de los niveles de BUN tratados con muestras de ensayo

Categoría	Niveles de BUN (mg/dl)
Normal	19,64±2,41
Control	163,04±28,67*
Control positivo (captopril)	96,82±35,08* ^{##}
Ejemplo 2 (Puerariae Radix: Mori Cortex = 1:1)	51,18±17,98* [#]
Ejemplo 3 (Puerariae Radix: Mori Cortex = 3:1)	86,86±60,37* ^{##}
Ejemplo 4 (Puerariae Radix: Mori Cortex = 1:3)	85,04±39,81 ^{##}

30 * $P < 0,01$, ** $P < 0,05$ (comparado con grupo normal); [#] $P < 0,01$, ^{##} $P < 0,05$ (comparado con grupo de control)

Ejemplo experimental 6: Medición de niveles de creatinina en sangre en ratas con fallo renal agudo

35 Se realizaron mediciones de niveles de creatinina en sangre para evaluar la eficacia de los dos extractos mezclados de esta invención contra la enfermedad renal.

1. Materiales y Métodos

Se usaron las mismas muestras de ensayo y animales que los del Ejemplo experimental 5 para este experimento. En el sacrificio se midieron los niveles de creatinina en sangre usando muestras de sangre recogidas.

2. Resultados

Como se muestra en la Tabla 14, los niveles de creatinina en sangre en ratas de control tratadas con vehículo fueron significativamente mayores ($p < 0,01$) que los de ratas normales.

Se observó que la elevación de los niveles de creatinina en ratas con fallo renal agudo inducido con CCDP se prevenía notoriamente mediante el extracto del Ejemplo 2 (Puerariae Radix: Mori Cortex = 1:1).

Tabla 14

Mediciones de niveles de creatinina en sangre

Categoría	Niveles de creatinina en sangre(mg/dl)
Normal	0,57±0,05
Control	2,34±0,69*
Control positivo (captopril)	1,36±0,27* ^{##}
Ejemplo 2 (Puerariae Radix: Mori Cortex = 1:1)	0,57±0,13 [#]
Ejemplo 3 (Puerariae Radix: Mori Cortex = 3:1)	1,11±0,33* ^{##}
Ejemplo 4 (Puerariae Radix: Mori Cortex = 1:3)	1,11±0,64 ^{##}

* $P < 0,01$ (comparado con grupo normal); [#] $P < 0,01$, ^{##} $P < 0,05$ (comparado con grupo de control)

Ejemplo experimental 7: Medición de áreas renales degeneradas en ratas con fallo renal agudo

Se usaron las mismas muestras y animales que los del Ejemplo experimental 5. El número de áreas renales degeneradas se midió de manera histopatológica para evaluar la eficacia de los extractos de hierbas de esta invención contra la insuficiencia renal.

El fallo renal que muestra una degeneración focal, tal como necrosis epitelial y degeneración en el túbulo se observó en todas las ratas tratadas con CCDP. Como se muestra en la Tabla 15, la neuropatía histopatológica se redujo de manera significativa en todos los grupos de tratamiento.

La relación de tejido parenquimal degenerativo en los riñones observada en ratas de control tratadas con vehículo fue significativamente mayor ($p < 0,01$) que la de ratas normales, mientras que el número de regiones degeneradas en las ratas tratadas con extracto fue significativamente menor ($p < 0,01$ o $p < 0,05$) histomorfométricamente que el de ratas de control tratadas con vehículo.

Se observó que la degeneración focal en ratas con fallo renal agudo inducido por CCDP se previno notoriamente mediante el extracto del Ejemplo 2 (Puerariae Radix: Mori Cortex = 1:1).

Tabla 15

Mediciones de área renal degenerada

Categoría	Número de áreas renales degeneradas (mg/dl)
Normal	4,52±3,44
Control	79,44±6,51*
Control positivo (captopril)	58,40±8,85 ^{##}
Ejemplo 2 (Puerariae Radix: Mori Cortex = 1:1)	36,33±5,85 ^{##}
Ejemplo 3 (Puerariae Radix: Mori Cortex = 3:1)	53,34±7,41* ^{##}
Ejemplo 4 (Puerariae Radix: Mori Cortex = 1:3)	51,44±10,11* ^{##}

* $P < 0,01$ (comparado con grupo normal); [#] $P < 0,01$, ^{##} $P < 0,05$ (comparado con grupo de control)

Ejemplo experimental 8: Ensayo de toxicidad aguda

1. Materiales y Métodos

Se distribuyeron de manera aleatoria ratones ICR SFP (sin patógeno específico, por sus siglas en inglés) machos y hembras de seis semanas (cinco animales por grupo). Se proporcionaron por vía oral extractos únicos de Puerariae Radix (Ejemplo 1) suspendidos antes de administración en disolución de metilcelulosa al 0,5% a ratones a dosis

únicas de 2.000 mg/kg, 1.000 mg/kg, 500 mg/ kg, 250 mg/kg y 125 mg/kg, respectivamente. Para todos los animales tratados con las muestras de ensayo, se observaron signos generales, peso corporal y animales muertos. Después de que se necrosaran todos los supervivientes, se examinaron totalmente órganos y tejidos, tales como cavidad abdominal y cavidad torácica. Además, se observaron de manera microscópica 12 órganos específicos.

5

2. Resultados

No se observaron signos clínicos ni síntomas o animales muertos en animales tratados con las muestras de ensayo. No hubo síntomas de signos de toxicidad en términos de peso corporal u observaciones de autopsia. El LD₅₀ oral del extracto de hierbas de esta invención fue mayor que 2.000 mg/kg en ratones.

10

Ejemplo experimental 9: Ensayo de toxicidad para dosificación de dos semanas repetida

1. Materiales y Métodos

15

Se distribuyeron de manera aleatoria ratones ICR SFP (sin patógeno específico) machos y hembras de seis semanas en 12 grupos (cinco animales por grupo). Se proporcionaron por vía oral extractos únicos de Puerariae Radix (Ejemplo 1) suspendidos antes de administración en agua destilada estéril a ratones con dosis únicas de 2.000 mg/kg, 1.000 mg/kg, 500 mg/ kg, 250 mg/kg y 125 mg/kg, respectivamente, durante el transcurso de dos semanas. Para todos los animales tratados con las muestras de ensayo, se observaron signos generales, peso corporal y animales muertos. Después de que se necrosaran todos los supervivientes, se examinaron de manera macroscópica órganos y tejidos, tales como cavidad abdominal y cavidad torácica.

20

2. Resultados

25

Se observó pérdida de peso corporal y absorción de alimento en ratones que recibieron la dosis de 2.000 mg/kg. Como no se indicaron observaciones anormales hasta la dosis máxima de 2.000 mg/kg, la dosis de tolerancia máxima para dosificación de dos semanas repetida fue mayor que 2.000 mg/kg en ambos sexos.

30

Por lo tanto, se sugirió que la dosis máxima para una administración repetida de 4 semanas fuera 2.000 mg/kg/10 ml/día en ambos sexos. Los regímenes medio y bajo son preferiblemente 1.000 mg/kg/10 ml/día y 500 mg/kg/10 ml/día, respectivamente.

35

Esta invención se describirá ahora por referencia a los siguientes ejemplos de fabricación, que son simplemente ilustrativos y que no se tienen que interpretar como una limitación del alcance de esta invención.

Ejemplo de fabricación 1: Conformación de comprimido

1. Conformación de comprimido que contiene extracto de Puerariae Radix

40

Usando un procedimiento de fabricación común, se preparó una conformación de comprimido que contenía extracto de Puerariae Radix en relaciones en peso de un extracto único de Puerariae Radix (Ejemplo 1; 70,0% en peso), lactosa (17,5% en peso), estearato de magnesio (5,0% en peso), vitamina C (2,5% en peso) y manitol (5,0% en peso).

45

2. Conformación de comprimido que contiene extracto mezclado

Se preparó una conformación de comprimido que contenía extractos mezclados de Puerariae Radix y Mori Cortex (70,0% en peso) en el mismo procedimiento que se siguió en la conformación de comprimido que contenía extracto de Puerariae Radix.

50

Ejemplo de fabricación 2: Conformación de cápsula

1. Conformación de cápsula que contiene extracto de Puerariae Radix

55

Usando un procedimiento de fabricación común, se preparó una conformación de cápsula que contenía extracto de Puerariae Radix en relaciones en peso de un único extracto de Puerariae Radix (Ejemplo 1; 85,0% en peso), carboximetilcelulosa (10,0% en peso) y estearato de magnesio (5,0% en peso).

60

2. Conformación de cápsula que contiene extracto mezclado

Se preparó una conformación de cápsula que contenía extractos mezclados de Puerariae Radix y Mori Cortex (85,0% en peso) en el mismo procedimiento que el seguido en la conformación de cápsula que contenía extracto de Puerariae Radix.

Ejemplo de fabricación 3: Preparación de bebidas de hierbas

1. Bebida de hierbas que contiene un único extracto de Puerariae Radix

5 Usando un método común, se preparó una única bebida de hierbas que contenía extracto de Puerariae Radix (preparado a partir del Ejemplo 1) de una manera que se mezclaba ese extracto de Puerariae Radix (5% en peso) con una mezcla que consistía en azúcar (7,78 % en peso), ácido cítrico (0,11% en peso), saborizante (0,1% en peso) y agua purificada (87,01% en peso).

10 2. Bebida de hierbas que contiene extracto mezclado

Se preparó una bebida de hierbas que contenía extractos mezclados de Puerariae Radix y Mori Cortex (5,0% en peso) y otros materiales, de la misma manera que se siguió en la bebida de hierbas que contenía el extracto de Puerariae Radix.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso en la prevención y/o el tratamiento de fallo renal que comprende extractos de hierbas seleccionados de Puerariae radix y Mori cortex en una relación en peso de 3:1 a 1:3, en la que los extractos de hierbas se pueden obtener por adición de agua a cada uno de Puerariae radix y Mori cortex en una relación en peso de 6:1, extracción con agua hirviendo durante dos horas y filtración para obtener el primer extracto
- 5 en la ebullición, adición de más agua al residuo en una relación en peso de 6:1, extracción con agua hirviendo durante una hora y filtración para obtener el segundo extracto en agua hirviendo, proporcionando una mezcla de los dos extractos en agua hirviendo, liofilización de la mezcla de los dos extractos en agua hirviendo para obtener un solo extracto en forma de polvo.

[Fig. 1]

