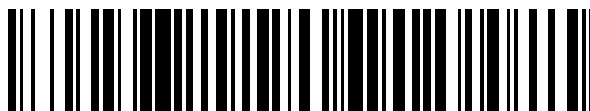


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 591**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 36/804 (2006.01)

A61K 36/234 (2006.01)

A61K 36/296 (2006.01)

A61K 36/487 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2008 E 08253757 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 2092940**

54 Título: **Fitoterapia para la osteoporosis y afecciones relacionadas**

30 Prioridad:

20.11.2007 GB 0722758

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

31.10.2013

73 Titular/es:

**MEDIPEARL PTE LTD (100.0%)
NO. 1 THIRD CHIN BEE ROAD
618679 SINGAPORE, SG**

72 Inventor/es:

**HWANG, SAN-BAO;
GUPTA, PRIYA y
CHEAH, SHIAU CHUEN**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 427 591 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

Fitoterapia para la osteoporosis y afecciones relacionadas

5 Antecedentes de la invención

[0001] La presente invención se refiere a una fitoterapia útil para el tratamiento de la osteoporosis y otras afecciones. Puede ser útil para la prevención o tratamiento de la obesidad y la diabetes. La medicina deriva de diversos materiales vegetales utilizados en la medicina china tradicional. Más específicamente, los autores han encontrado que una mezcla de seis materiales herbáceos tiene actividades deseables. Además, las actividades de la mezcla pueden potenciarse mediante fraccionamiento/purificación. De forma deseable, los materiales herbáceos individuales se fraccionan/purifican de forma individualmente apropiada antes de su mezcla con los otros materiales.

[0002] La osteoporosis es una enfermedad del esqueleto en la que el hueso pierde densidad. Los huesos se vuelven quebradizos y propensos a la fractura. Se diagnostica osteoporosis cuando la densidad ósea ha disminuido hasta el punto en que se producen fracturas con un leve esfuerzo. Los huesos que se rompen con mayor probabilidad debido a la osteoporosis son la cadena, la muñeca y la columna vertebral. Las mujeres postmenopáusicas son el grupo con mayor probabilidad de desarrollar osteoporosis, aunque no es infrecuente en varones mayores de 65 años.

[0003] La remodelación ósea es el proceso por el cual los huesos se rompen debido a la resorción y, a continuación, se construyen de nuevo mediante la formación ósea. Este es un proceso natural que tiene lugar durante todo el tiempo en diferentes partes del hueso del esqueleto. Normalmente, estos dos procesos se equilibran entre sí y se mantiene un nivel estable de masa ósea. Hasta que una persona sana tiene aproximadamente 40 años, el proceso de degradación y síntesis ósea por las células denominadas osteoclastos y osteoblastos es un sistema que se acopla de forma casi perfecta, estimulando una fase a la otra. Sin embargo, cuando una persona envejece o en presencia de determinadas condiciones, este sistema se rompe y los dos procesos se desequilibran.

[0004] Los osteoclastos son células óseas especializadas que degradan la masa ósea mediante un proceso denominado a menudo resorción ósea. La acción de los osteoclastos está equilibrada por la actividad de los osteoblastos que sintetizan la masa ósea. En los huesos de adultos sanos, la masa ósea permanece relativamente estable debido al equilibrio entre osteoblastos y osteoclastos y su trabajo en conjunto para mantener la masa ósea. Esto permite que los huesos se remodelen continuamente y se curen cuando se produzca un daño. La función de los osteoclastos puede verse afectada por diversos fármacos y nutrientes claves

[0005] En una reciente publicación, Lee y colaboradores (2007) hicieron la sorprendente observación de que el hueso, un tejido que previamente no se pensó afectara a la bioenergética, puede afectar a la adiposidad, metabolismo de la glucosa y sensibilidad a la insulina. Es sabido que las personas con obesidad y diabetes presentan anomalías del metabolismo óseo. El aumento de la adiposidad es un factor de riesgo de fractura en niños y las personas diabéticas son propensas a sufrir fracturas, aunque existen pocas evidencias de si están predispuestas a la osteoporosis (Schwartz y col., 2001).

[0006] Sin embargo, la tasa de recambio óseo disminuye en personas diabéticas como se refleja en la disminución de la expresión de biomarcadores de resorción y formación óseas, incluyendo la osteocalcina, una proteína específica de osteoblastos (Gerdhem y col., 2005, Osteoporosis Int., 16, (506-1512)). El pensamiento común mantiene que el aumento de la actividad de los osteoblastos (las células que sintetizan el hueso) es el resultado de las consecuencias de la diabetes, incluida la hiperglucemia, y de la disminución de los niveles de eficacia de la insulina y de IGF-1 (Inaba, 2004). Lee y col. (2007) presentan ahora datos para objetar esta noción y presentan el concepto provocativo de que la reducción de la función de los osteoblastos puede contribuir a la obesidad y a la intolerancia a la glucosa. En este escenario, podría entrarse en un círculo vicioso en el que las secuelas metabólicas de la diabetes supriman la función de los osteoblastos, induciendo la disminución de la bioactividad de la osteocalcina, lo que a su vez agravan más la obesidad y la resistencia a la insulina.

Resumen de la invención

[0007] Los autores han desarrollado un medicamento que puede aliviar o prevenir (o al menos retrasar su inicio) la osteoporosis y afecciones relacionadas mediante un ataque de doble vía en el que puede tanto aumentar la actividad de síntesis ósea (debida a los osteoblastos) como disminuir la actividad de resorción ósea (debida a los osteoclastos). Por tanto, el medicamento puede usarse para uno o más de los siguientes aspectos:

1. Tratamiento de la osteoporosis
2. Reducción de la tasa de fracturas óseas

3. Aumento de la densidad mineral ósea

4. Restablecimiento de la estructura ósea

5 5. Alivio de los síntomas de la menopausia como sequedad y sofocos. Adicionalmente, el medicamento puede usarse en el tratamiento de otras afecciones ligadas a las actividades de los osteoblastos y/u osteoclastos. Entre estas pueden incluirse obesidad, intolerancia a la glucosa y/o diabetes.

10 **[0008]** Se ha demostrado que el medicamento de la invención promueve la proliferación de los osteoblastos. Por tanto, se prevé que reduzca el peso corporal a través de la activación del mecanismo de los osteoblastos.

15 **[0009]** En aspectos adicionales, la invención se refiere a procedimientos de fabricación de medicamentos (que puede comprende las etapas de fraccionamiento de los componentes) y uso de componentes herbáceos en la fabricación de composiciones para su uso en terapia.

[0010] La presente invención se refiere a una composición derivada de seis materiales vegetales.

(i) Hierba epimedii 淫羊藿(Yin Yang Huo)

20 (ii) Fruto de *Psoraleae* (*Psoralea coryfolia*) 补骨脂(Bu Gu Zhi)

(iii) Raíz de *Rehmanniae preparatae* (*Rehmannia glutinosa*) 熟地黄(Shu Di)

25 (iv) Corteza de *Eucommiae* 杜仲(Du Zhong)

(v) Fruto de *Cnidii* 蛇床子(She Chuang Zhi)

(vi) Raíz de astrágalo (*Astragalus Membranaceus*) 黄芪(Huang Qi)

30 **[0011]** Algunos componentes de estos materiales vegetales han sido publicados en la literatura. Por ejemplo, se han publicado el ácido geniposídico de Du Zhong (Kim y col., 2003), el osthole de She Chuang Zi (Kuo y col. 2005), la corilina y la bavachina de Bu Gu Zhi (Wang y col. 2001) (Xiong y col., 2003), la icarrina de Yin Yang Huo (Xie y col. 2005) y polisacáridos de Shu Di (Oha y col. 2003) y Huang Qi.

35 **[0012]** Las composiciones preferidas de la invención contienen extractos de los 6 materiales herbáceos en la relación (en partes por peso):

(iv) Du Zhong: 2,5-10, preferably 4-8, most preferably 5 parts

40 (ii) Bu Gu Zi: 1,5-6, preferiblemente 2-4, más preferiblemente 3 partes.

(iii) Shu Di: 1,2-5,0, preferiblemente 1,5-3, más preferiblemente 2,5 partes.

45 (v) She Chuang Zhi: 1-4, preferiblemente 1,2-2,8, más preferiblemente 2 partes.

(vi) Huang Qi: 0,3-1,5, preferiblemente 0,5-1,0, más preferiblemente 0,75 partes.

(i) Yin Yang Huo: 0,15-0,75, preferiblemente 0,25-0,5, más preferiblemente 0,375 partes.

50 Los extractos se producen preferiblemente mediante extracción con etanol para (i), (ii), (iv) y (v) y extracción con agua para (iii) y (vi). Estos extractos iniciales pueden estar parcialmente purificados, ilustrándose en este documento técnicas adecuadas.

55 **[0013]** Las composiciones de la invención pueden contener además componentes como, por ejemplo, adyuvantes y/o excipientes convencionales. Pueden contener además principios activos, p. ej., una fuente de calcio como carbonato calcio que puede ser proporcionado por calcio de concha de ostras o polvo de perla. De forma adecuada, la composición, que puede estar en forma de unidad de administración, proporciona de 0-1.400 mg de calcio al día.

60 **[0014]** Entre los excipientes pueden incluirse lactosa o almidón. Entre otros excipientes frecuentes se incluyen estearato de magnesio, dextrina, povidona, celulosas, talco y sacarosa. Una función puede ser contrarrestar la tendencia de los materiales herbáceos a absorber la humedad y volverse grumosos. Entre otras posibles funciones de los excipientes se incluyen aromatizantes (p. ej., edulcorantes) y coloreantes. Los excipientes pueden

comprender aglutinantes, desintegrantes, cargas (diluyentes) y lubricantes. Las formulaciones líquidas pueden incluir vehículos líquidos, por ejemplo, agua.

Breve descripción de los dibujos

5 **[0015]**
La figura 1 (i) a (vi) es un conjunto de gráficas en la que se muestra la actividad de 6 extractos herbáceos individuales sobre los osteoclastos.

10 La figura 2 es una gráfica similar a la de la figura 1 en la que se muestra la actividad de mezclas de extractos de los 6 materiales herbáceos.

15 La figura 3 (i) a (vi) es un conjunto de gráficas en las que se muestra la actividad de 6 extractos herbáceos individuales ((i) Yin Yang Huo; (ii) Bu Gu Zhi; (iii) Shu Di; (iv) Du Zhong; (v) She Chuang Zhi y (vi) Huang Qi) sobre los osteoblastos.

20 Las figuras 4a y 4b son gráficos similares a los de la figura 3 en los que se muestra la actividad de mezclas de los extractos de los 6 materiales herbáceos, a las 24 horas (figura 4a) y a las 48 horas (figura 4b).

La figura 4c es una gráfica en la que se muestran los mejores ajustes de las curvas de actividad de las mezclas sobre la actividad de proliferación de los osteoblastos.

25 La figura 5 es una gráfica en la que se muestran las actividades de la mezcla (sin y con purificación parcial) sobre el índice de masa ósea femoral.

Las figuras 6 y 7 son las curvas de dosis respuesta para la mezcla (sin y con purificación parcial) sobre la densidad mineral ósea en el fémur (figura 6) y en la columna lumbar (figura 7).

30 La figura 8 es una gráfica en la que se relaciona la dosis con la estructura parcialmente purificadas con la variación en el peso corporal.

Descripción de las realizaciones preferidas

Procedimientos de extracción

[0016] Se extrajeron las seis hierbas, individualmente, con etanol acuoso al 70% y agua y se compararon los resultados. Para cada hierba, se usaron 3 muestras diferentes obtenidas a partir de diferentes fuentes.

40 (a) Extracción de la hierba sin procesar (i) (Yin Yang Huo):

(a) usando EtOH al 70%: 500 g de hojas secas de Ying Yang Huo se trituraron y extrajeron con 4 l de EtOH al 70% (etanol de grado ACS obtenido de Megachem) durante una hora, tres veces a reflujo. El extracto combinado se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío.

45 (b) usando agua: 500 g de hojas secas de Yin Yang Huo se trituraron y extrajeron con 5 l del agua durante dos horas, dos veces a reflujo. El extracto combinado se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío.

50 (b) Extracción de la hierba sin procesar (ii) (Bu Gu Zhi):

(a) usando EtOH al 70%: 500 g de frutos secos de Bu Gu Zhi se trituraron y extrajeron con 4 l de EtOH al 70% durante una hora, tres veces a reflujo. El extracto combinado se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío.

55 (b) usando agua: 500 g de frutos secos de Bu Gu Zhi se trituraron y extrajeron con 5 l de agua durante dos horas, dos veces a reflujo. El extracto combinado se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío.

(c) Extracción de la hierba sin procesar (iii) (Shu Di):

60 (a) usando EtOH al 70%: frutos secos de Shu Di (500 g) se extrajeron con 4 l de EtOH al 70% durante una hora, tres veces a reflujo. Los extractos se filtraron y el filtrado se concentró y secó al vacío.

(b) usando agua: plantas secas de Shu Di (500 g) se extrajeron con 5 l de agua durante dos horas, dos veces a reflujo. Los extractos se filtraron y el filtrado se concentró y secó al vacío.

(d) Extracción de la hierba sin procesar (iv) (Du Zhong):

(a) usando EtOH al 70%: la corteza secada al aire de Du Zhong (500 g) se troceó y extrajo con 4 l de EtOH al 70% durante una hora, tres veces a reflujo. El extracto combinado se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío.

(b) usando agua: 500 g de corteza seca de Du Zhong se trocearon y extrajeron con 5 l de agua durante dos horas, dos veces a reflujo. El extracto combinado se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío.

(e) Extracción de la hierba sin procesar (v) (She Chuang Zhi):

(a) usando EtOH al 70%: 500 g de frutos secos de She Chuang Zhi se trocearon y extrajeron con 4 l de EtOH al 70% durante una hora, tres veces a reflujo. El extracto combinado se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío.

(b) usando agua: 500 g de frutos secos de She Chuang Zhi se molieron y extrajeron con 5 l de agua durante dos horas, dos veces bajo reflujo. El extracto combinado se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío.

(f) Extracción de la hierba sin procesar (vi) (Huang Qi):

(a) usando EtOH al 70%: 500 g de raíces secas de Huang Qi se extrajeron con 4 l de EtOH al 70% durante una hora, tres veces a reflujo. El extracto combinado se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío.

(b) usando agua: 500 g de raíces secas de Huang Qi se extrajeron con 5 l de agua durante dos horas, dos veces a reflujo. El extracto combinado se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío.

Análisis por HPLC de los extractos en crudo:

[0017] Los análisis por HPLC de los extractos se realizaron usando un módulo de separación Waters 2695 acoplado a un detector de absorbancia Water 2487 doble λ y software Empower Pro. El sistema de HPLC estaba equipado con una columna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) con cartucho protector C18 de 3mm. Los análisis se realizaron a temperatura ambiente. Cada muestra se preparó a una concentración de 1 mg/ml usando EtOH al 60% como disolvente. El volumen de inyección de la muestra fue de 20 μ l. La fase móvil era una mezcla de acetonitrilo y ácido fórmico al 0,1% a un flujo de 1,0 ml/min y el procedimiento utilizado fue fullscan_2b. Los cromatogramas de HPLC se registraron a una longitud de onda de 254 nm y 315 nm. Los detalles del procedimiento de HPLC se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 procedimiento de HPLC

Ácido fórmico al 1% en % de H ₂ O	% de ACN	Tiempo (min)
96	5	0
50	50	30
20	80	31
20	80	35
96	4	35
96	4	40

[0018] Los disolventes de grado HPLC se obtuvieron de Fisher Scientific, las muestras patrón de Osthole e Icarrina se obtuvieron del fabricante China Pharmaceutical and Biological y el patrón de ácido geniposídico se obtuvo de Chroma Dex.

[0019] Los resultados del análisis por HPLC se incluyen en la tabla 2.

Tabla 2. Rendimientos de extracción y principios activos de tres diferentes fuentes de China

Planta procesar	Rendimiento de extracción		% de principio activo	
	Agua	EtOH al 70%	Extracción con agua	Extracción con EtOH al 70%
Bu Gu Zhi (ii)	28,55 %	30 %	-	-
	39,33 %	29,16 %	-	-
	31,09 %	27,90 %	-	-
She Chuang Zhi	20,07 %	21 %	Sin pico	0,91 % (Osthole)
	24,68%	18,48 %	Sin pico	1,56 % (Osthole)

	16,86 %	22,47 %	Sin pico	1,90 % (Osthole)
Du Zhong (iv)	14 %	15 %	0,12 % (AGP)	0,27 % (AGP)
	14,03 %	12,14 %	0,90 % (AGP)	2,33 % (AGP)
	12,80 %	15,63 %	0,17 % (AGP)	1,22 % (AGP)
Yin Yang Huo (i)	22 %	17,30 %	0,28 % (icarrina)	0,75 % (icarrina)
	11,53 %	11,62 %	0,25 % (icarrina)	2,86 % (icarrina)
	15,72 %	12,95 %	0,59 % (icarrina)	0,85 % (icarrina)
Shu Di (iii)	76 %	67,65 %	-	-
	68,10 %	61,87 %	-	-
	70,31 %	65,61 %	-	-
Huang Qi (vi)	54 %	34 %	-	-
	36,35 %	29,40 %	-	-
	36,20 %	33,24 %	-	-

[0020] A partir de los resultados, se llegó a la conclusión de utilizar la extracción con EtOH al 70% para las hierbas (i), (ii), (iv) y (v) y la extracción con agua para las hierbas (iii) y (vi).

5 Preparación de los extractos (a mayor escala):

Extracción:

10 **[0021]** Extracción de la hierba sin procesar (i) (Yin Yang Huo) usando EtOH al 70%: 2 kg de hojas secas de Yin Yang Huo se trituraron y extrajeron con 16 l de EtOH al 70% durante una hora, tres veces a reflujo. El extracto combinado se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío.

Rendimiento: 12,98%

15 **[0022]** Extracción de la hierba sin procesar (ii) (Bu Gu Zhi) usando EtOH al 70%: 750 g de frutos secos de Bu Gu Zhi (obtenidos de He Bei) se trituraron y extrajeron con 6 l de EtOH al 70% durante una hora, tres veces a reflujo. El extracto combinado se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío.

Rendimiento: 29,3%

20 **[0023]** Extracción de la hierba sin procesar (iv) (Du Zhong) usando EtOH al 70%: la corteza secada al aire de Du Zhong (1,5 kg) se troceó y extrajo con 12 l de EtOH al 70% durante una hora, tres veces a reflujo. El extracto combinado se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío.

25 Rendimiento: 12,14%

30 **[0024]** Extracción de la hierba sin procesar (v) (She Chuang Zhi) usando EtOH al 70%: 700 g de frutos secos de She Chuang Zhi se trocearon y extrajeron con 5,6 l de EtOH al 70% durante una hora, tres veces a reflujo. El extracto combinado se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío.

Rendimiento: 22,74%

35 **[0025]** Extracción de la hierba sin procesar (iii) (Shu Di) usando agua: plantas secas de Shu Di (300 g) se extrajeron con 3 l de agua durante dos horas, dos veces a reflujo. El extracto combinado se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío.

Rendimiento: 55,8%

40 **[0026]** Extracción de la hierba sin procesar (vi) (Huang Qi) usando agua: 600 g de corteza seca de Huang Qi extrajeron con 6 l de agua durante dos horas, dos veces a reflujo. El extracto combinado se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío.

Rendimiento: 29,8%

45 Preparación de la composición (sin refinar)

[0027] Los extractos de las hierbas sin procesar obtenidos anteriormente se mezclan en la proporción (Bu Gu Zhi: She Chuang Zi: Yin Yang Huo: Shu Di: Du Zhong: Huang Qi 1,5: 1: 1,5: 1,25: 1,25: 1,5) para obtener 1 kg de la composición.

50

Nombre de la hierba	Cantidad del extracto crudo
Bu Gu Zhi (ii)	187,5 g
She Chuang Zi (v)	125 g
Yin Yang Huo (i)	187,5 g
Shu Di (iii)	156,25 g
Du Zhong (iv)	156,25 g
Huang Qi (vi)	187,5 g

[0028] Se desarrollaron procedimientos para la purificación parcial (o «fraccionamiento») de los extractos: Purificación parcial del extracto crudo de (i) (Yin Yang Huo): se empaquetó una columna (55 x 700 mm) con gel de sílice (60-230 mesh) usando acetato de etilo. Se preparó una pasta de 35 g del extracto crudo (extracto con EtOH al 70%) de Yin Yang Huo usando 350 g de gel de sílice en MeOH. La fracción activa se eluyó usando MeOH al 20% en acetato de etilo (5 litros) como eluyente. La fracción se concentró y secó al vacío. Se repitió el mismo procedimiento 10 veces.

Rendimiento: 29,4%

[0029] Purificación parcial del extracto crudo de (ii) (Bu Gu Zhi): se usó una resina a base de dextrano entrecruzada lipófila (en este ejemplo, Sephadex LH-20). Esta se prehidrató en MeOH durante la noche y, a continuación, se empaquetó en una columna (55 x 700 mm). Se disolvieron 3,5 g del extracto crudo (extracto en EtOH al 70%) de Bu Gu Zhi se disolvió en 100 ml de MeOH usando sonicación y se cargó en la columna. Se usaron aproximadamente 4 litros de MeOH como eluyente. La fracción de MeOH se concentró y evaporó a sequedad al vacío. Se repitió el mismo procedimiento 4 veces.

Rendimiento: 70,1%

[0030] Purificación parcial del extracto crudo de (iii) (Shu Di): se tomaron 358 g del extracto crudo (extracto en agua) de Shu Di y se disolvieron en 350 ml de agua y, a continuación, se añadió lentamente EtOH al 100% para formar el precipitado. La cantidad total de EtOH al 100% añadido fue de 2,8 l. La mezcla se mantuvo en un frigorífico durante la noche para completar la precipitación y, a continuación, se filtró. El residuo obtenido se secó al vacío durante 24 horas.

Rendimiento: 29,32%

[0031] Purificación parcial del extracto crudo de (iv) (Du Zhong): se empaquetó una columna (55 x 700 mm) con gel de sílice (60-230 mesh) usando acetona. Se preparó una pasta de 35 g del extracto crudo (extracto con EtOH al 70%) de Du Zhong usando 350 g de gel de sílice en MeOH. La fracción activa se eluyó usando acetona (10 litros) como eluyente. La fracción se concentró y secó al vacío. Se repitió el mismo procedimiento 6 veces.

Rendimiento: 29,4%

[0032] Purificación parcial del extracto crudo de (v) (She Chuang Zhi): se colocaron 200 g del extracto crudo (extracto en EtOH al 70%) de She Chuang Zhi en un matraz de fondo redondo de 5 l. Se añadió acetona (4 l) y se agitó durante 1 hora, a continuación, se filtró. El residuo se agitó durante 1 hora con 4 l más de acetona. Se repitió el mismo procedimiento 6 veces. Finalmente, los ocho filtrados se combinaron, concentraron y secaron durante al noche al vacío.

Rendimiento: 41,41%

[0033] Purificación parcial del extracto crudo de (vi) (Huang Qi): se tomaron 158 g del extracto crudo (extracto en agua) de Huang Qi y se disolvieron en 150 ml de agua y, a continuación, se añadió lentamente EtOH al 100% para formar el precipitado. La cantidad total de EtOH al 100% fue de 1,2 l. La mezcla se mantuvo en un frigorífico durante la noche para completar la precipitación y, a continuación, se filtró. El residuo obtenido se secó al vacío durante 24 horas.

Rendimiento: 64,5%

[0034] Las muestras parcialmente purificadas o fraccionadas de los extractos en crudo de las hierbas si procesar obtenidos anteriormente se mezclaron en la proporción (Bu Gu Zhi: She Chuang Zi: Yin Yang Huo: Shu Di: Du Zhong: Huang Qi 1,5: 1: 1,5: 1,25: 1,25: 1,5) para obtener 500 g de la muestra de AGM parcialmente purificada.

Nombre de la planta	Cantidad de muestras parcialmente purificada
Bu Gu Zhi	93,75 g
She Chuang Zi	62,5 g
Yin Yang Huo	93,75 g
Shu Di	78,125 g
Du Zhong	78,125 g
Huang Qi	93,75 g

Acción de los extractos herbáceos en crudo y parcialmente purificados sobre los osteoclastos

5 [0035] Se realizó un estudio para elucidar la eficacia de las hierbas en la antiproliferación de los osteoclastos de rata *in vitro*.

Materiales

10 [0036] Todos los componentes de los medios se obtuvieron de Sigma-Aldrich (EE.UU.) siempre que no se estableciera otra cosa. El suero fetal de ternera se obtuvo de Hyclone, EE. UU. El kit de tinción de TRAP, la solución de Tripsina-EDTA al 0,25%, el MTT (bromuro de tetrazolio azul tiazolilo) y el DMSO se obtuvieron de Sigma-Aldrich, EE. UU. Todos los productos químicos eran del grado más alto disponible en Sigma Chemical Co.. Las placas de 96 pocillos se obtuvieron de NUNC, Dinamarca.

Procedimientos

Preparación de cultivos de osteoclastos

20 [0037] Se obtuvieron los fémures de ratas wistar hembras jóvenes de 3-4 semanas de vida (100-125 g) tras su sacrificio. Los fémures se lavaron 4 veces (30 ml cada vez) con medio de lavado del fémur, medio esencial mínimo α (α -MEM) que contenía penicilina G a 1 mg/ml, gentamicina a 0,5 mg/ml y fungizona a 3 mg/ml. Se eliminaron las epífisis de los fémures de las ratas. Las células de la médula ósea se obtuvieron usando una jeringa para lavar los fémures a partir de ambos extremos del hueso con α -MEM que contenía suero fetal de ternera (Hyclone) al 15% (v/v), penicilina G a 0,1 mg/ml, gentamicina a 0,05 mg/ml, fungizona a 300 ng/ml, ácido L-ascórbico 2-fosfato 0,28 mM, dexametasona 10 nM, M-CSF a 10 ng/ml, RANKL a 10 ng/ml y TNF- α a 10 ng/ml. Se recogió el medio de ambos extremos de los fémures y se centrifugaron a 300 g durante 3 minutos. Tras la centrifugación, se eliminaron dos tercios del sobrenadante desde la parte superior. Las fracciones restantes se usaron como fuente de precursores de osteoclastos. Las suspensiones celulares se mezclaron y se inocularon 0,1 ml (1×10^5 células de médula ósea) en cada pocillo de placas de 96 pocillos (NUNC). Las células se incubaron a 37°C, con CO₂ al 5% y 100% de humedad. El medio se cambió a las 24 horas por medio para osteoclastos y las células se realimentaron 3 veces a la semana.

Tinción de células TRAP-positivas

35 [0038] Los osteoclastos se resuspendieron en α -MEM fenol que contenía SFT al 15% y se dispusieron en placas a una concentración de 5×10^5 células/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos en presencia de RANKL a 10 ng/ml y se incubaron durante 24 h. El medio y los factores se sustituyeron a los 3 días. Después de 5 días de cultivo, las células se fijaron y tiñeron para detectar fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), una enzima marcador típica de osteoclastos usando el kit de tinción de TRAP comercial (Sigma, 387-A) según las instrucciones del fabricante. Las células TRAP+ con más de tres núcleos se contaron como MNC TRAP-positivas.

Ensayo de proliferación

45 [0039] Las curvas de dosis respuesta para los extractos en crudo y parcialmente purificados, individualmente y como combinación de 6 hierbas, se determinaron mediante el ensayo antiproliferación determinado mediante MTT (bromuro de tetrazolio azul tiazolilo) como porcentaje de supervivencia de los osteoclastos de rata en una microplaca de 96 pocillos. Se sembraron 10.000 células cancerosas viables en fase exponencial de crecimiento en 100 μ l por pocillo de una microplaca de 96 pocillos. Las células se cultivaron durante la noche para que se adhirieran a la placa a 37°C en una atmósfera con dióxido de carbono al 5%. El medio usado para cada pocillo se eliminó a la mañana siguiente y se añadieron 200 μ l de medio fresco. Se añadieron 2 μ l de muestras de hierbas a diversas concentraciones en cada pocillo y la placa se incubó a 37°C en una atmósfera de dióxido de carbono al 5% durante 24 horas.

55 [0040] La cantidad adecuada de MTT se disolvió en medio sin suero para obtener una concentración de medio de 1 mg/ml. Se transfirieron 50 μ l de la solución de MTT dentro de cada pocillo. Las células se incubaron durante 4 horas a 37°C en una atmósfera de dióxido de carbono al 5%. Se aspiró el medio del pocillo y se añadieron

150 µl de DMSO a cada pocillo para disolver el precipitado de azul de formazán. A continuación, se midió la absorbancia óptica del MTT reducido a 550 nm usando un lector de microplacas. El porcentaje de células viables se calculó con la siguiente fórmula: OD de la muestra/OD control x 100%.

5 **Resultados**

[0041] La figura 1 contiene las gráficas en las que se muestra la actividad antiproliferación de los diversos materiales sobre los osteoclastos. Todos los valores se expresan como la media ± desviación estándar.

10 [0042] Los triángulos hacen referencia a los extractos en crudo; los cuadrados hacen referencia a materiales parcialmente purificados.

15 [0043] La figura 1 (i) muestra que el extracto crudo de Yin Yang Huo inhibía la proliferación de los osteoclastos (37%) a 500 µg/ml, mientras que la fracción parcialmente purificado que contenía icarrina inhibía el 54% de la proliferación de los osteoclastos a 500 µg/ml. Yin Yang Huo modulaba la osteoclastogénesis inhibiendo la proliferación de los osteoclastos(Xie y col. 2005). Además de esto, el tratamiento con Yin Yang Huo puede suprimir de forma eficaz el aumento inducido por OVX del recambio óseo posiblemente debido tanto a un aumento en las actividades osteoblásticas como a una disminución de la osteoclastogénesis (Xie y col. 2005).

20 [0044] La figura 1 (ii) muestra que el extracto crudo de Bu Gu Zhi inhibía la proliferación (33%) de los osteoclastos a 500 µg/ml. Pero la fracción parcialmente purificada que contenía corilina y bavaquina inhibía la proliferación de los osteoclastos de forma eficaz (50%) a 500 µg/ml. La concentración necesaria para inhibir la proliferación de los osteoclastos es menor en la fracción parcialmente purificada en comparación con el extracto crudo de Bu Gu Zhi.

25 [0045] La figura 1 (iii) muestra que el extracto crudo de Shu Di inhibía la proliferación de los osteoclastos (37%) a 500 µg/ml. La fracción parcialmente purificada de Shu Di que contenía polisacáridos inhibía el 48% de la proliferación de los osteoclastos, que era el 11% más en comparación con el extracto crudo. Du Zhong Shu Di inhibía la proliferación de los osteoclastos en forma dependiente de la dosis.

30 [0046] La figura 1 (iv) muestra que Du Zhong inhibía la proliferación de los osteoclastos en forma dependiente de la dosis. El extracto crudo de Du Zhong inhibía la proliferación (30%) de los osteoclastos a 500 µg/ml, mientras que la fracción parcialmente purificada del extracto crudo que contenía ácido geniposídico (AGP) inhibía de forma eficaz la proliferación del 47% de los osteoclastos a 500 µg/ml.

35 [0047] La figura 1 (v) muestra que el extracto crudo de She Chuang Zhi inhibía la proliferación de los osteoclastos a 500 µg/ml (32%). La fracción parcialmente purificada que contenía osthole inhibía la proliferación de los osteoclastos a 500 µg/ml hasta en un 54%. She Chuang Zhi inhibía la formación y diferenciación de los osteoclastos según también publicaron Qin y col. 2003. She Chuang Zi inhibía la formación y diferenciación de los osteoclastos disminuyendo e inhibiendo la actividad de TRAP de osteoclastos. Además de esto, también disminuía el área agujereada de resorción ósea osteoclástica y la liberación de Ca²⁺ de los cortes óseos (Qin y col. 2003).

40 [0048] La figura 1 (vi) muestra que el extracto crudo de Huang Qi inhibía la proliferación de los osteoclastos a 500 µg/ml (31%). La fracción parcialmente purificada que contenía polisacáridos mostró el aumento de los efectos antiproliferación sobre los osteoclastos a 50 µg/ml (48%). La concentración necesaria para inhibir los osteoclastos es menor en el parcialmente purificado en comparación con el extracto crudo de Huang Qi.

45 [0049] Para las 6 hierbas, la fracción parcialmente purificada mostró resultados positivos mayores en comparación con el extracto crudo. Los efectos antiproliferación sobre los osteoclastos se resumen en la **Tabla 3**.

50 [0050] La potencia de los componentes fraccionados también pueden expresarse como ED₅₀ (concentración del componente en crudo extraído o parcialmente fraccionado que presenta una inhibición del 50%). Los resultados se resumen en la **Tabla 4**.

55 **Tabla 3.** Resumen de la actividad antiproliferación sobre los osteoclastos de los extractos herbáceos individuales antes y después de la purificación parcial.

Nombre	Origen	Actividad del extracto crudo a 500 µg/ml sobre osteoclastos	Principio activo	Actividad de la fracción activa a 500 µg/ml sobre osteoclastos
Shu Di	He Bei	Proliferación inhibida el 37%	Polisacárido	Proliferación inhibida el 48%
Huang Qi	He Bei	Proliferación inhibida	Polisacárido	Proliferación inhibida

		el 31%		el 48%
She Chuang Zi	He Bei	Proliferación inhibida el 33%	Osthole	Proliferación inhibida el 54%
Yin Yang Huo	Shi Chuan	Proliferación inhibida el 37%	Icarrina	Proliferación inhibida el 54%
Du Zhong	Bo Chou	Proliferación inhibida el 30%	AGP	Proliferación inhibida el 47%
Bu Gu Zhi	He Bei	Proliferación inhibida el 33%	Corilina y bavaquina	Proliferación inhibida el 50%

Tabla 4. ED₅₀ de la actividad antiproliferación sobre osteoclastos de extractos vegetales individuales antes y después de la purificación parcial.

		EC ₅₀ (g/ml)	Potencia relativa
Shu Di	Parcialmente purificado	4,83E-04	4,22
	Extracto crudo	2,04E-03	
Huang Qi	Parcialmente purificado	4,53E-04	14,97
	Extracto crudo	6,78E-03	
She Chuang Zi	Parcialmente purificado	3,03E-04	15,63
	Extracto crudo	4,73E-03	
Du Zhong	Parcialmente purificado	4,95E-04	5,85
	Extracto crudo	2,90E-03	
Bu Gu Zhi	Parcialmente purificado	4,06E-04	15,92
	Extracto crudo	6,46E-03	
Ying Yang Huo	Parcialmente purificado	2,70E-04	4,38
	Extracto crudo	1,18E-03	

5 **[0051]** Se realizaron pruebas similares usando composiciones de 6 extractos en crudo (2 versiones) y 6 extractos parcialmente purificados. Los resultados se muestran en la figura 2, donde los círculos rellenos representan la primera composición en crudo; los triángulos representan la segunda composición en crudo y los círculos vacíos representan la composición parcialmente purificada. La segunda versión del extracto crudo presentaba una mejor actividad de inhibición de la proliferación de los osteoclastos en comparación con la primera versión a la misma concentración. Además, la fracción parcialmente purificada (que derivaba de los extractos usados en el segundo extracto crudo) inhibía el 46% el crecimiento de los osteoclastos a 500 µg/ml en comparación con la segunda versión del extracto crudo que inhibía el 39% del crecimiento a 500 µg/ml.

15 Los valores de EC₅₀ fueron:

[0053]

1 ^{er} extracto crudo:	2,71 x 10 ⁻³ g/ml
2 ^o extracto crudo:	2,94 x 10 ⁻³ g/ml
Parcialmente purificado:	5,27 x 10 ⁻⁴ g/ml

Acción de los extractos herbáceos en crudo y parcialmente purificados sobre los osteoblastos

20 **[0054]** Se realizó un estudio para elucidar la eficacia de las hierbas sobre la proliferación de los osteoblastos humanos hFOB.

Materiales

25 **[0055]** La línea celular osteoblástica fetal humana condicionalmente inmortalizada hFOB se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Va., <http://www.atcc.org>). hFOB se desarrolló inmortalizado de forma condicional osteoblastos fetales humanos con un mutante sensible a la temperatura del gen del antígeno T grande de SV40 (*ts-SV40LTA*). A la temperatura permisiva de 33,5° C, el *ts-SV40LTA* se activa y las células hFOB proliferan rápidamente, mientras que a la temperatura no permisiva de 39,5° C, el *ts-SV40LTA* se inactiva y las células se diferencian y muestran el fenotipo de osteoblastos maduros. El suero fetal de ternera se obtuvo de Hyclone, EE. UU. G418, el medio de Ham 12:DMEM (1:1), la solución de Tripsina-EDTA al 0,25%, el MTT (bromuro de tetrazolio azul tiazolilo) y el DMSO se obtuvieron de Sigma-Aldrich, EE. UU. La placas de 96 pocillos se obtuvieron de NUNC, Dinamarca.

35

Procedimientos

Líneas celulares

5 **[0056]** Las células hFOB se cultivaron según el protocolo de la ATCC en una mezcla 1:1 de medio de Ham F12 y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal de ternera al 10%, G410 a 0,3 mg/ml, denominado de ahora en adelante medio completo. Las células se cultivaron a 34° C en una atmósfera húmeda de CO₂ al 5%/aire al 95%

10 Ensayo de proliferación

[0057] Las curvas de dosis respuesta de los seis extractos herbáceos en crudo individuales, las seis fracciones parcialmente purificadas y las composiciones que contiene material de las seis hierbas se determinaron mediante un ensayo de proliferación determinado mediante MTT (bromuro de tetrazolio azul tiazolilo) en base al porcentaje de supervivencia de los osteoblastos, hFOB en microplacas de 96 pocillos.

15 **[0058]** Se sembraron 10.000 células cancerosas viables en fase exponencial de crecimiento en 100 µl por pocillo de una microplaca de 96 pocillos. Las células se cultivaron durante la noche para que se adhieran a la placa a 37°C en una atmósfera con dióxido de carbono al 5%. El medio usado para cada pocillo se eliminó a la mañana siguiente y se añadieron 200 µl de medio fresco. Se añadieron 2 µl de muestras herbáceas a diversas concentraciones en cada pocillo y la placa se incubó a 37° C en una atmósfera de dióxido de carbono al 5% durante 24 horas.

20 **[0059]** El MTT se disolvió en medio sin suero para obtener una concentración de 1 mg de MTT/ml de medio. Se transfirieron 50 µl de la solución de MTT dentro de cada pocillo. Las células se incubaron durante 4 horas a 37° C en una atmósfera de dióxido de carbono al 5%. Se aspiró el medio del pocillo y se añadieron 150 µl de DMSO a cada pocillo para disolver el precipitado de azul de formazán. A continuación, se midió la absorbancia óptica del MTT reducido a 550 nm usando un lector de microplacas. El porcentaje de células viables se calculó con la siguiente fórmula: OD de la muestra/OD control x 100%.

30 Resultados

[0060] Las gráficas de los resultados se muestran en la figura 3. Los rombos representan los extractos en crudo; los cuadrados representan el material parcialmente purificado. Todos los valores se expresan como la media ± desviación estándar.

35 **[0061]** La figura 3 (i) muestra que el extracto crudo de Yin Yang Huo inducía la proliferación de los osteoblastos hFOB (8%) a 200 µg/ml, mientras que la fracción parcialmente purificada que contenía icarrina inducía la proliferación de los osteoblastos hFOB (20%) a 100 µg/ml. La concentración necesaria para inducir a los osteoblastos es menor y la actividad de proliferación es mayor en la fracción parcialmente purificada en comparación con el extracto crudo. Yin Yang Huo aumentaba la tasa de recambio óseo para recuperar la pérdida de arquitectura ósea trabecular en ratas mediante su acción directa de estimulación de la formación ósea e inhibición de la resorción ósea (Xie y col. 2005).

40 **[0062]** La figura 3 (ii) muestra que el extracto crudo de Bu Gu Zhi inducía la proliferación (20%) de los osteoblastos a 50 µg/ml. Pero la fracción parcialmente purificada que contenía corilina y bavaquina inducía la proliferación (20%) de los osteoblastos hFOB a 25 µg/ml. La concentración necesaria para inducir a los osteoblastos es menor en la fracción parcialmente purificada en comparación con el extracto crudo de Bu Gu Zhi (50 µg/ml).

45 **[0063]** Corilina de *Psoralea coryfolia* (Bu Gu Zhi) mostraba una actividad de estimulación de la proliferación osteoblástica en la línea celular UMR 106 cultivada *in vitro*. Los flavonoides corilina y bavaquina se aislaron e identificaron como principios activos mediante fraccionamiento dirigido por la actividad. (Wang y col. 2001). Los resultados sugerían que los extractos de los frutos de *Psoralea coryfolia* y la coralina y la bavaquina podrían estimular la formación ósea o tener una posible actividad frente a la osteoporosis. Xiong y col. (2003) también observaron el efecto del extracto y de la fracción de la coralina del extracto de *Psoralea coryfolia* L. sobre la actividad osteoblástica. Estos efectos sugiere que el extracto de *Psoralea coryfolia* L. y la corilina podrían estimular la formación del hueso (Xiong y col. 2003).

50 **[0064]** La figura 3 (iii) muestra que el extracto crudo de Shu Di inducía la proliferación de los osteoblastos hFOB (7%) a 50 µg/ml. La fracción parcialmente purificada de Shu Di que contenía polisacáridos no inducía proliferación de los osteoblastos hFOB. No se observó aumento de la concentración ni tampoco en la actividad de proliferación de los osteoblastos en la fracción parcialmente purificada del extracto crudo de Shu Di.

55 **[0065]** La figura 3 (iv) muestra que el extracto crudo de Du Zhong inducía una pequeña proliferación (5%) de

los osteoblastos hFOB a 100 µg/ml, mientras que la fracción parcialmente purificada del extracto crudo que contenía ácido geniposídico (AGP) inducía una mayor proliferación del 13% de los osteoblastos hFOB a 100 µg/ml.

[0066] El AGP de la corteza de *Eucommiae* (Du Zhong) aumenta la proliferación de células similares a osteoblastos, aumenta el crecimiento óseo y también suprime la pérdida ósea, como publicaron Kim y col. (2003). Además de esto, Ha (2003) también publicó que el extracto de corteza de *Eucommia* y sus componentes ácido geniposídico, geniposido y aucubina aumentaban la proliferación de células similares a osteoblastos estimulando la osteogénesis. Además, usando el cultivo conjunto de células de médula ósea de ratón y células ST-2, estos extractos y compuestos inhibían las actividades osteoclasticas (Ha 2003).

[0067] La figura 3 (v) muestra que el extracto crudo de She Chuang Zhi inducía la proliferación de osteoblastos hFOB a 100 µg/ml (7%). La fracción parcialmente purificada que contenía osthole inducía proliferación de los osteoblastos hFOB a 12,5 µg/ml (12%). La concentración necesaria para inducir a los osteoblastos es menor en la fracción parcialmente purificada en comparación con el extracto crudo de She Chuang Zhi. Kuo y col. (2005) publicaron que osthole de los frutos de *Cnidii* (She Chuang Zi) inducía significativamente la diferenciación de dos líneas celulares similares a osteoblastos humanas, MG-63 y hFOB.

[0068] Como publicaron Meng y col. (2004) los extractos de los frutos de *Cnidium monnieri* (L) Cuss (umbelífera) se analizaron usando las células similares a osteoblastos UMR106 *in vitro*. Se aislaron tres coumarinas (osthole, bergapteno e imperatorina) y se estudiaron sus efectos sobre la proliferación osteoblástica. Osthole, el principal principio farmacológicamente activo, promueve significativamente la actividad celular. El bergapteno y la imperatorina fueron menos eficaces que el osthole. Estos resultados sugieren que los extractos de *Cnidium monnieri* (L.) Cuss podrían tener una actividad potencial frente a la osteoporosis y su fracción parcialmente purificada podrían contener principios activos que estimulan a los osteoblastos. (Meng y col. 2004).

[0069] Como se muestra en la figura 3 (vi), el extracto crudo de Huang Qi inducía la proliferación de los osteoblastos hFOB a 100 µg/ml (17%). La fracción parcialmente purificada que contenía polisacáridos inducía la proliferación de los osteoblastos hFOB a 50 µg/ml (15%). La concentración necesaria para inducir a los osteoblastos es menor en la fracción parcialmente purificada en comparación con el extracto crudo de Huang Qi.

[0070] Estos resultados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: actividad de los extractos herbáceos individuales sobre los osteoblastos

Nombre	Actividad del extracto crudo	Principio activo	Actividad de la fracción activa
Shu Di	Inducía proliferación (10 %) a 50 µg/ml	Polisacárido	Sin mejora significativa
Huang Qi	Inducía proliferación (17 %) a 100 µg/ml	Polisacárido	Inducía proliferación (15 %) a 50 µg/ml
She Chuang Zhi	Inducía proliferación (7 %) a 100 µg/ml	Osthole	Inducía proliferación (12 %) a 12,5 µg/ml
Yin Yang Huo	Inducía proliferación (8 %) a 200 µg/ml	Icarrina	Inducía proliferación (20 %) a 100 µg/ml
Du Zhong	Inducía proliferación (5 %) a 100 µg/ml	AGP	Inducía proliferación (13 %) a 100 µg/ml
Bu Gu Zhi	Inducía proliferación (20 %) a 50 µg/ml	Corilina y bavaquina	Inducía proliferación (20 %) a 25 µg/ml

[0071] Se realizaron pruebas similares usando composiciones que contenían los 6 extractos en crudo (2 versiones) y 6 extractos parcialmente purificados. Los resultados se muestran en la figura 4a (actividad a la 24 horas) y figura 4b (actividad a las 48 horas). Los rombos y los cuadrados representan las versiones primera y segunda, respectivamente, de las composiciones «en crudo» mientras que los triángulos representan las composiciones «purificadas». Puede observarse que la segunda versión es un poco más activa que la primera versión «en crudo», mientras que la composición «purificada» es mucho más activa: después de 24 horas (figura 4a) la segunda versión «en crudo» estimulaba el crecimiento el 17% a 200 µg/ml. Después de 48 horas (figura 4b): las actividades de proliferación sobre osteoblastos no son muy alentadores a las 48 horas. Solo puede apreciarse una proliferación de 6% de los osteoblastos a la concentración de 50 µg/ml en el tratamiento con la fracción parcialmente purificada a las 48 horas en comparación con el 18% a 50 µg/ml a las 24 horas de tratamiento con la fracción parcialmente purificada a las 24 horas. Los osteoblastos (hFOB) morían a las 48 horas de tratamiento con la fracción parcialmente purificada y con el extracto crudo en comparación con las células control. El mejor ajuste de curva de las versiones primera y segunda «en crudo» y de la composición «purificada» sobre la actividad de proliferación de osteoblastos (hFOB) se muestra en la figura 4c. Los rombos y los triángulos representan las versiones primera y segunda «en crudo» mientras que los círculos representan la «composición purificada».

Modelos en animales

[0072] Se realizaron pruebas para medir los efectos del «extracto el crudo» (segunda versión «en crudo») y de la composición «purificada».

[0073] Los materiales habían sido probados en ratas ovariectomizadas, un modelo animal de osteoporosis popular y generalmente aceptado.

[0074] Tras la administración por vía oral de forma continua durante tres meses a 0,12, 0,25, 0,5 y 0,8 g/kg/día, dos veces al día, se midieron y calcularon el índice de masa ósea, el peso húmedo y seco del fémur y las densidades minerales óseas del fémur y lumbar. Los pesos corporales de las ratas se determinaron semanalmente. Los resultados se resumen en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6: índice de masa ósea y peso húmedo del fémur (mg/cm) de las ratas de todos los grupos experimentales

Grupos	Rata N.º	Índice de masa ósea (x ± DE)	Peso húmedo (mg/cm) (x ± DE)
Control normal pseudooperado	12	4,1404 ± 0,36233	198,3774 ± 12,47043
Modelo ovariectomizado	12	3,4909 ± 0,47565 ^{##}	190,7690 ± 8,2086
Fosamax®	10	3,4202 ± 0,24757	205,8757 ± 18,31985 ^{**}
Extracto crudo			
1,4 g/kg	11	3,6026 ± 0,49182	193,8621 ± 7,94890
0,5 g/kg	10	13,4736 ± 0,18521	192,6831 ± 13,58409
Parcialmente purificado			
0,12 g/kg	11	3,4200 ± 0,29461	188,8743 ± 9,34391
0,25 g/kg	11	3,5885 ± 0,24125	197,8749 ± 11,43143
0,5 g/kg	11	3,7375 ± 0,32996	195,5449 ± 23,14863
0,8 g/kg	6	4,1492 ± 0,34708 ^{**}	197,7648 ± 12,56049
#: p<0,05 comparado con el control normal pseudooperado ##: p<0,01 comparado con el control normal pseudooperado *: p<0,05 comparado con el control normal ovariect **: p<0,01 comparado con el control ovariectomizado			

[0075] En base a los datos del índice de masa ósea femoral, la curva de dosis respuesta puede ajustarse de la mejor forma con un valor de ED₅₀ de 0,474 g/kg/día, administrado dos veces al día, como se muestra en la figura 5. En comparación con el extracto crudo preparado como se describe en el documento (archivo A de patente GuMiAn), los principios activos parcialmente purificados eran aproximadamente 4 veces más potentes.

[0076] En la figura 5 se muestran las d curvas dosis respuesta de los principios activos parcialmente purificados (círculos rellenos) y extracto crudo (círculos vacíos) sobre el índice de masa ósea femoral en el modelo animal de osteoporosis en animales ovariectomizados. Todos los valores se expresan como la media ± desviación estándar. Los puntos de datos se ajustaron con un programa de regresión no lineal, GraphPad Prism versión 3.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego Calif, EE. UU., www.graphpad.com.

[0077] Se determinaron las densidades minerales óseas del fémur y la región lumbar de la columna vertebral. Los valores se tabularon en la tabla 7. Para la DMO del fémur, Fosamax® y los principios activos parcialmente purificados a todas las dosis eran estadísticamente significativos a partir de los valores del grupo del modelo en animales ovariectomizados. Sin embargo, para los valores de DMO de la columna lumbar, solo los grupos a los que se administró Fosamax®, el extracto crudo GuMiAn a 1,4 g/kg/día y GuMiAn parcialmente purificado a 0,5 g/kg/día mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de modelo de animales ovariectomizados.

[0078] Las curvas de dosis respuestas del extracto crudo GuMiAn y GuMiAn parcialmente purificado pueden encontrar su mejor ajuste con un programa de software de regresión no lineal (figura 6 para el fémur y figura 7 para la columna vertebral). La mejora de la potencia *in vivo* está claramente indicada.

Tabla 7. Densidades minerales óseas del fémur y la columna lumbar de cada grupo experimental

Grupos	Rata N.º	Fémur (x±DE)	Columna lumbar (x±DE)
Control normal pseudooperado	12	0,1371 ± 0,00349	0,1497 ± 0,0544
Modelo ovariectomizado	12	0,1309 ± 0,00452#	0,1415 ± 0,00425#
Fosamax®	10	0,1436 ± 0,00483**	0,1610 ± 0,00774**
Extracto crudo			
1,4 g/kg	11	0,1322 ± 0,00602	0,1518 ± 0,00627**
0,5 k/kg	10	0,1307 ± 0,00732	0,1456 ± 0,01165
Parcialmente purificado			
0,12 g/kg	11	0,1358 ± 0,00536*	0,1451 ± 0,00633
0,25 g/kg	11	0,1362 ± 0,00522*	0,1470 ± 0,00897
0,5 g/kg	11	0,1382 ± 0,00477**	0,1517 ± 0,01008**
0,8 g/kg	6	0,1365 ± 0,00460*	0,1462 ± 0,00939
#: p<0,05 comparado con el control normal pseudooperado			
##: p<0,01 comparado con el control normal pseudooperado			
*: p<0,05 comparado con el control normal ovariectomizado			
**: p<0,01 comparado con el control ovariectomizado			

5 [0079] En la figura 6 se muestran las de curvas dosis respuesta de extractos GuMiAn parcialmente purificado (círculos rellenos) y en crudo de GuMiAn sobre la densidad mineral ósea del fémur en un modelo animal de osteoporosis en animales ovariectomizados. Todos los valores se expresan como la media ± desviación estándar. Los puntos de datos se ajustaron con un programa de regresión no lineal, GraphPad Prism versión 3.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego Calif. EE. UU., www.graphpad.com.

10 [0080] En la figura 7 se muestran las de curvas dosis respuesta de extractos GuMiAn parcialmente purificado (círculos rellenos) y en crudo de GuMiAn sobre la densidad mineral ósea de la columna lumbar en un modelo animal de osteoporosis en animales ovariectomizados. Todos los valores se expresan como la media ± desviación estándar. Los puntos de datos se ajustaron con un programa de regresión no lineal, GraphPad Prism versión 3.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego Calif. EE. UU., www.graphpad.com.

15 **Obesidad**

[0081] Se determinaron los efectos de la composición purificada sobre el peso corporal de las ratas en los grupos descritos anteriormente

20 [0082] Se determinó el peso corporal de cada grupo experimental de animales semanalmente y se apreció que las ratas ovariectomizadas presentaban un pronunciado aumento del peso corporal en comparación con el grupo control normal pseudooperado. El tratamiento de los animales ovariectomizados con la composición parcialmente purificada mostró una disminución significativa en el aumento del peso corporal. En la figura 8 se muestra una curva de la media del aumento del peso corporal de los animales tratados con una ED₅₀ de 0,27 g/kg/día.

25 [0083] Los puntos de datos se ajustado con un programa de regresión no lineal, GraphPad Prism versión 3,00 para Windows, GraphPad Software, San Diego Calif. EE. UU., www.graphpad.com.

30 **Estudios en humanos**

[0084] Se ha llevado a cabo un estudio piloto de la seguridad y eficacia de una composición según la invención cuando se administró a mujeres osteoporóticas postmenopáusicas.

35 [0085] Para este estudio, el «extracto crudo» («GZS») se formuló en cápsulas.

Procedimientos

40 [0086] En el estudio se incluyó a mujeres con osteoporosis definida como una puntuación de la densidad mineral ósea (DMO) de <2,5 la DE de la masa ósea máxima en la cadera y/o en la columna vertebral. Todos los sujetos llevaban >5 años de postmenopausia, hasta la edad de 70 años Los sujetos otorgaron su consentimiento informado. Los sujetos con disfunción renal, de tiroides o paratiroides, con enfermedad importante, diabéticos que necesitaban insulina y estaban tomando esteroides, bisfosfonatos, terapia de sustitución hormonal o calcitonina fueron excluidos del estudio.

45 [0087] El estudio es un ensayo clínico abierto aleatorizado de 18 semanas de tratamiento y con 9 meses de

seguimiento. Las pacientes recibieron 2 comprimidos al día de Ca y Vit D2 (grupo control) o Ca y Vit D + cápsulas de GZS (grupo de tratamiento).

- 5 **[0088]** Marcadores de formación ósea: fosfatasa alcalina específica de hueso y marcadores de resorción ósea: se evaluaron la desoxipiridolona urinaria y el N-telopéptido entrecruzado urinario. La DMO se evaluó al inicio y al final del estudio.

Resultados

- 10 **[0089]** Se incluyó en el estudio a 22 sujetos, 4 asignados aleatoriamente al grupo control y 18 al grupo de tratamiento. Finalizaron el estudio 18 sujetos. Se retiraron 3 sujetos del grupo activo y 1 sujeto del grupo control, respectivamente. No se observaron cambios significativos en la formación ósea ni en los marcadores de resorción. La media (\pm DE) de los cambios en la DMO en los grupos de control y tratamiento son las siguientes: cadena: -11,26 y -2,51 por ciento y columna vertebral: -3,80 y -3,82 por ciento, respectivamente. No se observaron fracturas en
15 ninguno de los grupos. Siete pacientes se quejaron de efectos adversos menores con las cápsulas de GZS, como «calentamiento del organismo», cefalea y pesadez intestinal.

Conclusiones

- 20 **[0090]** En mujeres osteoporóticas postmenopáusicas, la composición según la invención parece reducir la pérdida ósea medida en las caderas pero no en la columna vertebral en el periodo del estudio de 9 meses. Esta parece ser segura solo con efectos adversos mínimos. Son necesarios estudios más extensos y a más largo plazo para confirmar su eficacia para mejora la pérdida ósea.

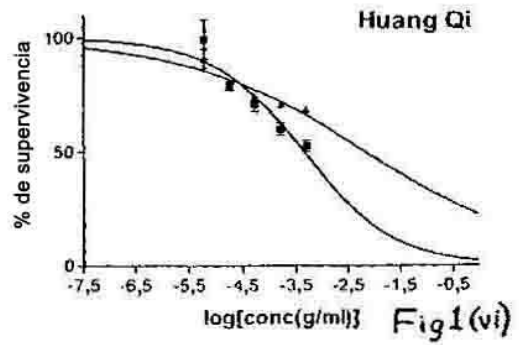
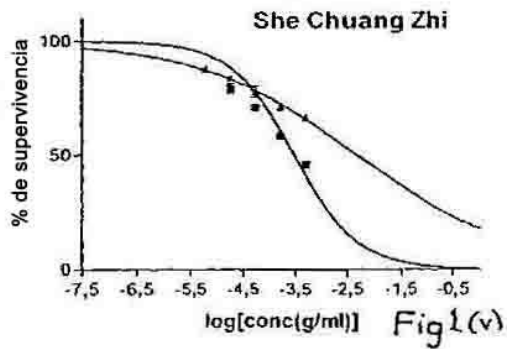
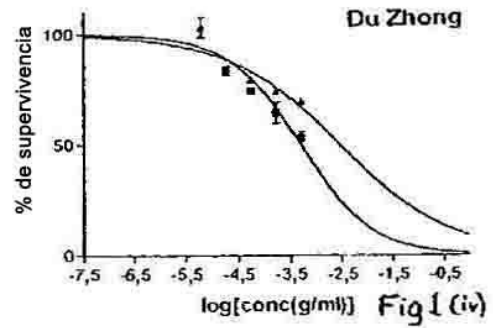
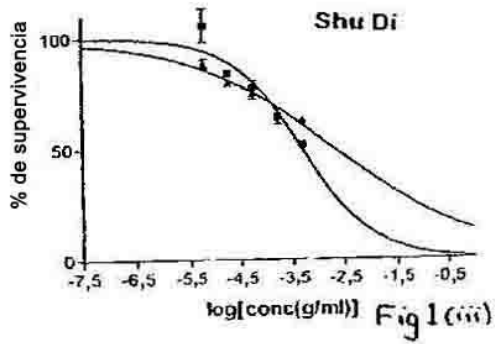
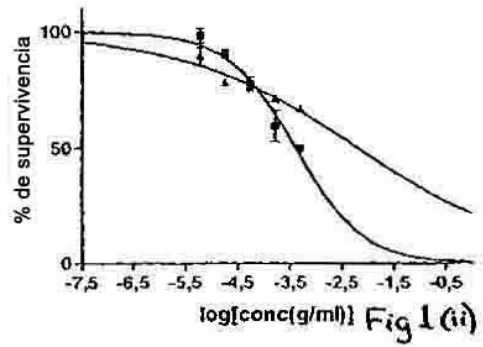
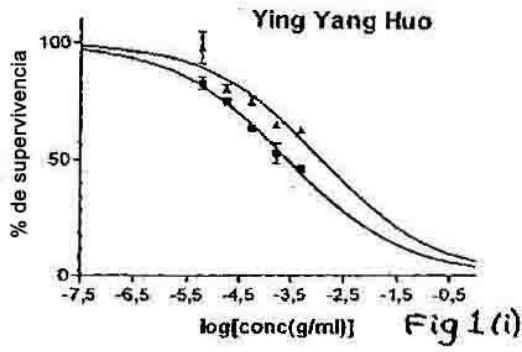
Bibliografía

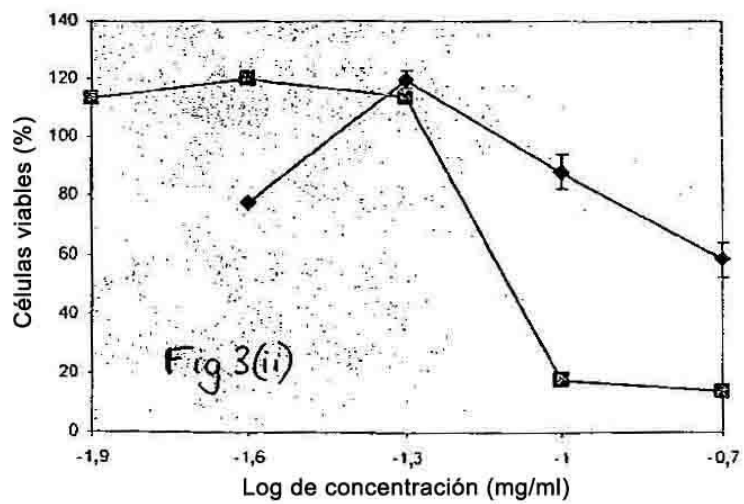
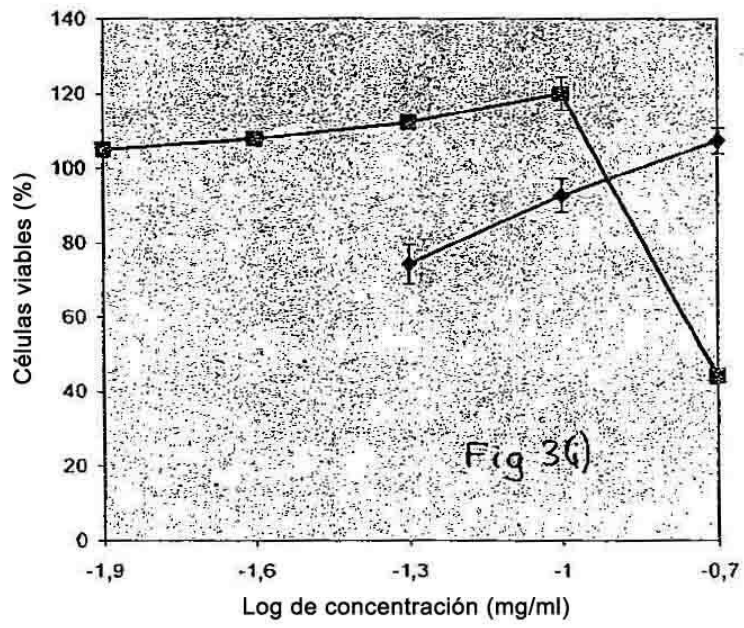
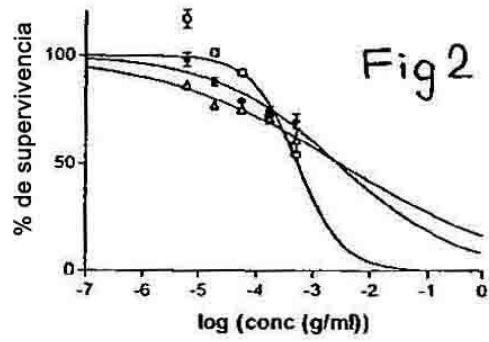
- [0091]** Kim y col. 2003. Effects of *Eucommiae Cortex* on osteoblast-like cell proliferation and osteoclast inhibition: Arch of Pharm Research 26(11): 929-936. Kuo, P. L., Hsu, Y. L., Chang, C. H. y Chang, J. K. 2005. Osthole-mediated cell differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in human osteoblast cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 314: 1290-1299. Oh, K. O., Kim, S. W., Kim, J. Y., Ko, S. Y., Hyun-Man Kim, H. M., Baek, J. H., Ryoo, H. M. y Kim, J. K. 2003. Effect of *Rehmannia glutinosa* Libosch extracts on bone metabolism. Clinica Chimica Acta 334:185-195. Wang, D. W., Li, F. M. & Jiang, Z. M. 2001. Osteoblastic proliferation stimulating activity of *Psoralea corylifolia* extracts and two of its flavanoids. Planta Med 67: 748-749. Xie, F., Wu, C. F., Lai, W. P., Yang, X. J., Cheung, P. Y., Yao, X. S., Laung, P. C. y Wong, M. S. 2005. The osteoprotective effect of Herba epimedii (HEP) extract in vivo and in vitro. Evidence-based complementary and Alternative Medicine 2(3): 353-361. Xiong, Z., Wang, D; Xu, Y. y Li, F. 2003. Osteoblastic differentiation bioassay and its application to investigating the activity of fractions and compounds from *Psoralea corylifolia* L. Pharmazie. 2003; 58(12):925-928. Lee, N. K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J. D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P. J., McKee, M. D., Jung, D. Y. y col. (2007). Cell, 130, 456-469. Goulding, A., Jones, I. E., Taylor, R. W., Williams, S. M., y Manning, P. J. (2001). J. Pediatr. 139, 509-515. Schwartz, A. V., Sellmeyer, D. E., Ensrud, K. E., Cauley, J. A., Tabor, H. K., Schreiner, P. J., Jamal, S. A., Black, D. M., Cummings, S. R., (2001). J. Clin. Endocrinol. Metab. 86, 32-38. Gerdhem, P., Isaksson, A., Akesson, K. y Obrant, K. J. (2005). Osteoporos. Int. 16, 1506-1512. Inaba, M. (2004). J. Bone Miner. Metab. 22, 287-292.

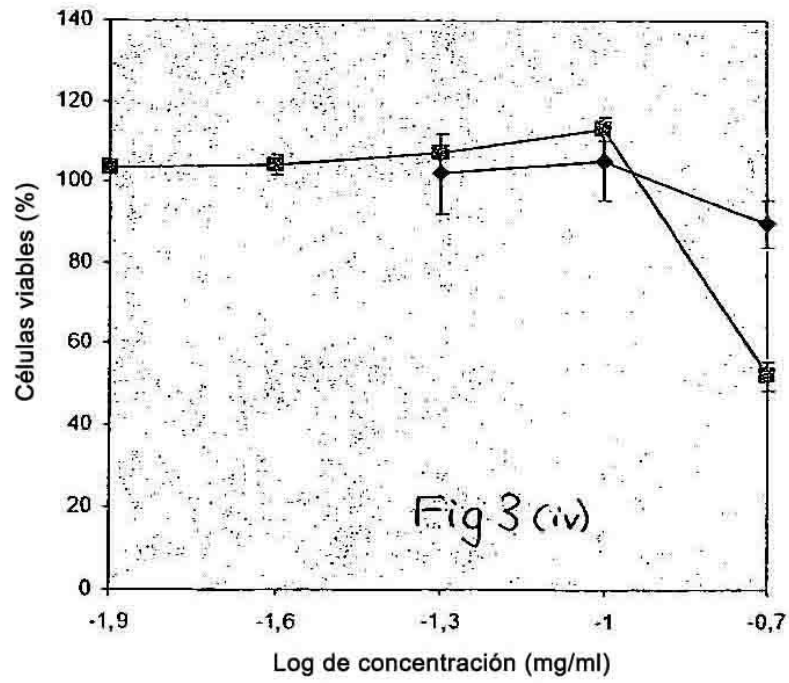
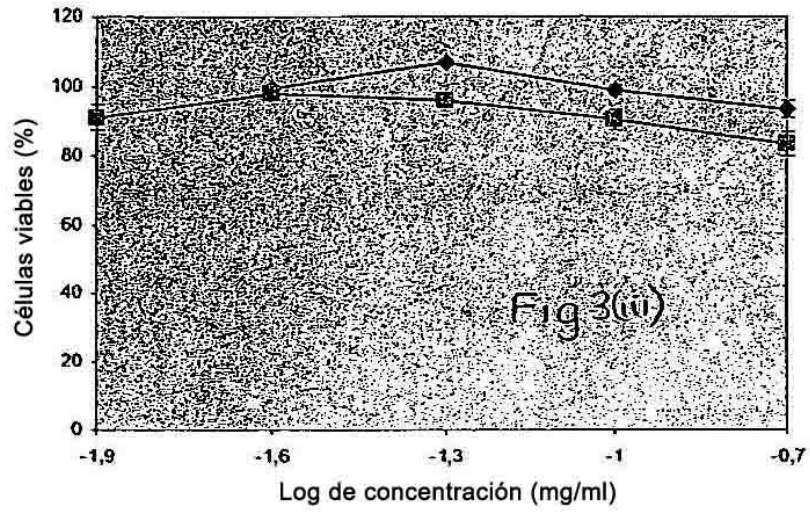
REIVINDICACIONES

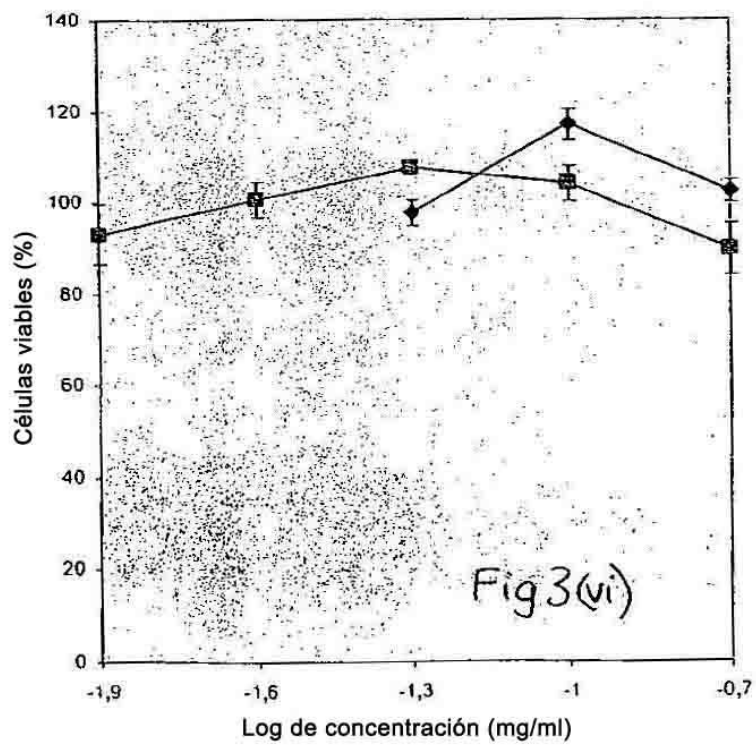
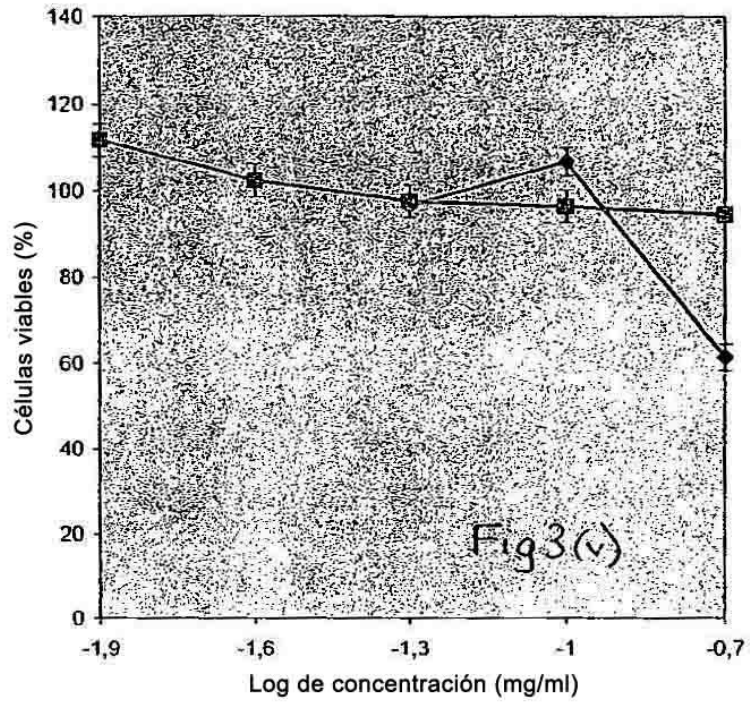
- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende los siguientes 6 materiales herbáceos o extractos de los mismos: (i) Yin Yang Huo; (ii) Bu Gu Zhi; (iii) Shu Di; (iv) Du Zhong; (v) She Chuang Zhi y (vi) Huang Qi.
2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1 que comprende extractos de los seis materiales herbáceos producidos mediante un proceso que comprende la extracción con agua o con un disolvente alcohólico.
- 10 3. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 la cual contiene extractos de (i) Yin Yang Huo, (ii) Bu Gu Zhi, (iv) Du Zhong y (v) She Chuang Zhi producidos mediante extracción con un disolvente alcohólico.
- 15 4. Una composición farmacéutica según la reivindicación 3 en la que el disolvente alcohólico es etanol acuoso, preferiblemente etanol acuoso al 70%.
5. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende extractos de (iii) Shu Di y (vi) Huang Qi producidos mediante extracción con agua.
- 20 6. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el componente (i) se produce mediante fraccionamiento de un extracto de Yin Yang Huo mediante cromatografía en gel de sílice.
- 25 7. Una composición farmacéutica según cualquiera de la reivindicaciones precedentes en la que el componente (ii) se produce mediante fraccionamiento de un extracto de Bu Gu Zhi mediante cromatografía en una resina a base de dextrano entrecruzada lipófila.
- 30 8. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el componente (iii) se produce mediante fraccionamiento de un extracto de Shu Di mediante su precipitación a partir de una solución acuosa por adición de etanol.
- 35 9. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el componente (iv) se produce mediante fraccionamiento de un extracto de Du Zhong mediante cromatografía en gel de sílice.
- 40 10. Una composición farmacéutica según cualquier reivindicación precedentes en la que el componente (v) se produce mediante fraccionamiento de un extracto de She Chuang Zhi extrayendo un extracto seco con acetona, seguido de evaporación hasta sequedad del extracto con acetona.
- 45 11. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el componente (vi) se produce mediante fraccionamiento de un extracto de Huang Qi mediante su precipitación a partir de una solución acuosa por adición de etanol.
- 50 12. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que contiene extractos de dichos materiales herbáceos en la proporción, en partes por peso:
- (i) Yin Yang Huo: 0,15 - 0,75 partes;
- (vi) Huang Qi: 0,3 - 1,5 partes;
- (v) She Chuang Zhi: 1-4 partes;
- (iii) Shu Di: 1,2-5,0 partes;
- 55 (ii) Bu Gu Zhi 1,5- 6 partes; y
- (iv) Du Zhong: 2,5-10 partes.
- 60 13. Una composición farmacéutica según la reivindicación 12 en la que las proporciones son:
- (i) 0,25 – 0,5 partes;
- (vi) 0,5 – 1,0 partes;

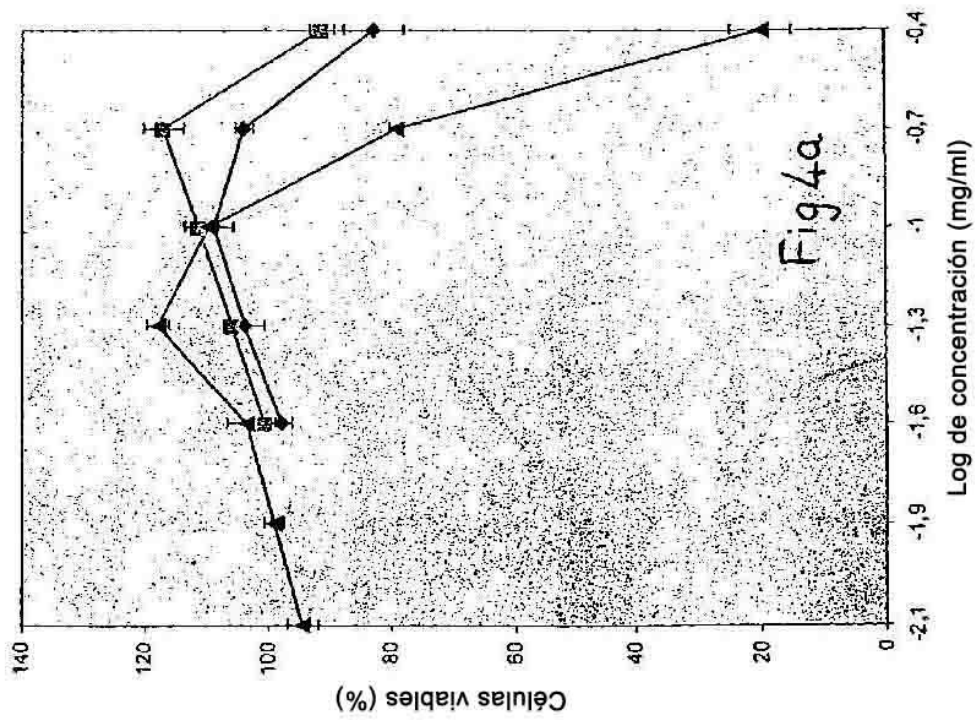
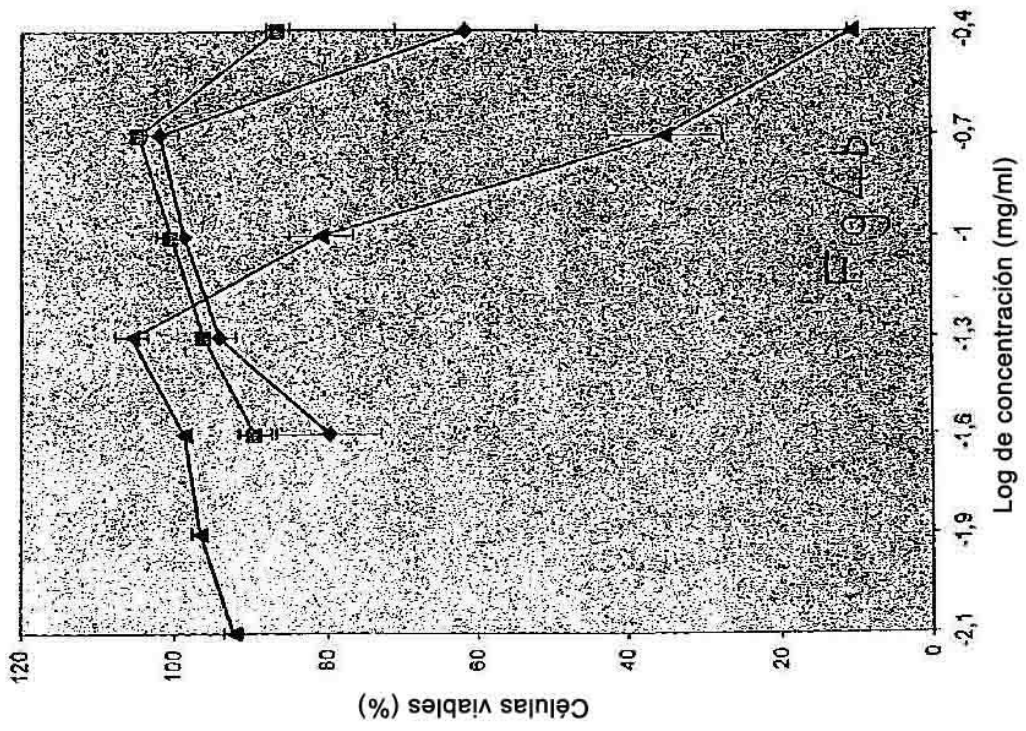
- (v) 1,2 – 2,8 partes;
- (iii) 1,5 – 3,0 partes;
- 5 (ii) 2 - 4 partes; y
- (iv) 4 – 8 partes.
- 10 14. Una composición farmacéutica según la reivindicación 12 en la que las proporciones son:
- (i) 0,375 partes de Yin Yang Huo; (vi) 0,75 partes of Huang Qi;
- (v) 2 partes de She Chuang Zhi; (iii) 2,5 partes de Shu Di
- 15 (ii) 3 partes de Bu Gu Zhi y (iv) 5 partes de Du Zhong.
15. Un procedimiento para producir una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que incluye un paso de preparación de extractos de dichos materiales herbáceos.
- 20 16. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para su uso en el tratamiento de una afección ligada a las actividades de los osteoblastos y/o los osteoclastos, seleccionada entre osteoporosis, síntomas menopáusicos, obesidad, intolerancia a la glucosa y diabetes.
- 25 17. Una composición según cualquiera de la reivindicaciones 1 a 14 para su uso en el tratamiento de un mamífero para uno o más de entre: reducción de la tasa de fractura ósea, aumento de la densidad mineral ósea o recuperación de la estructura ósea.

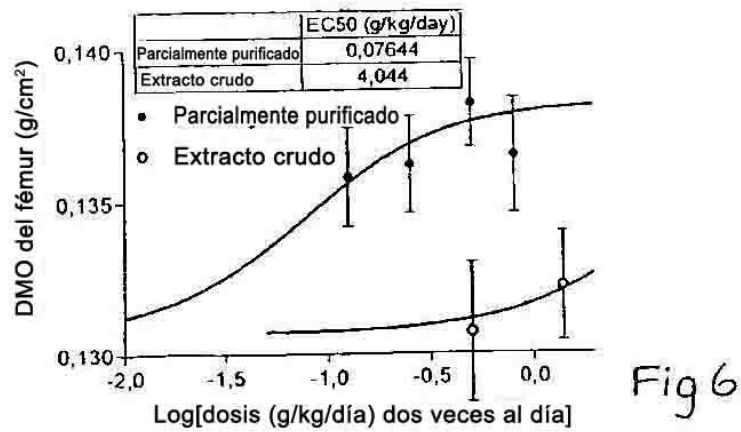
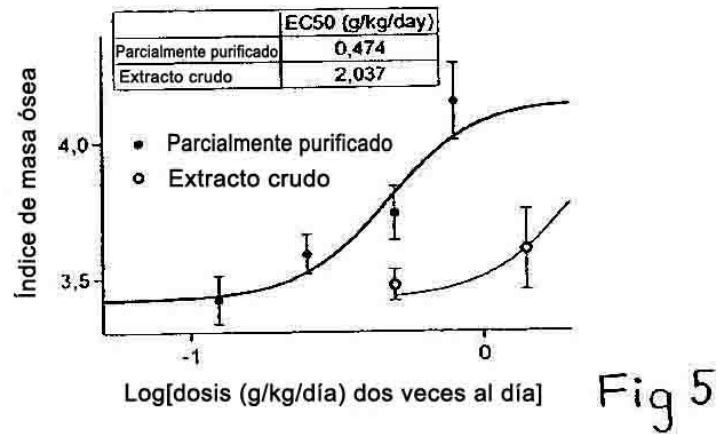
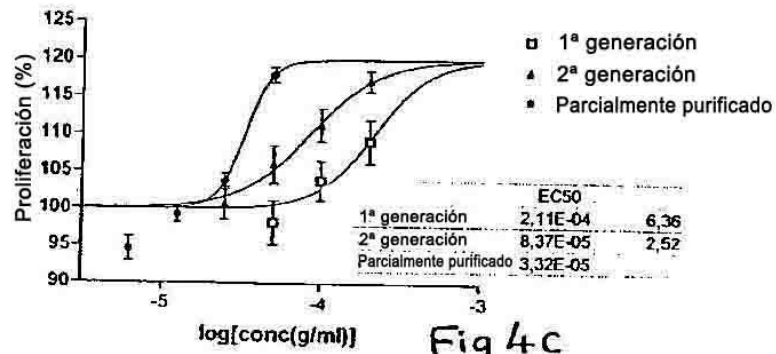












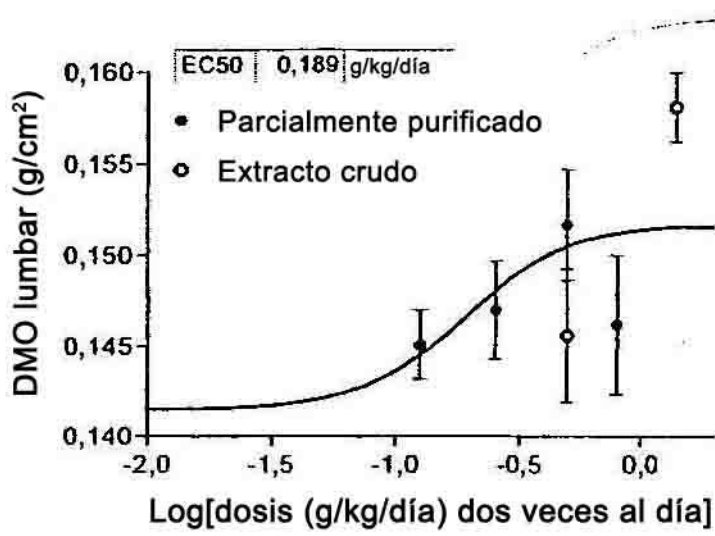


Fig 7

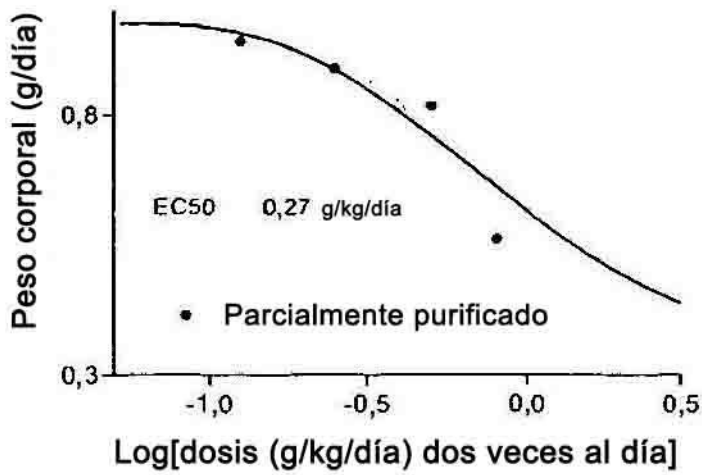


Fig 8