

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 114**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/36** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2005** **E 10150086 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013** **EP 2246061**

54 Título: **Extracto de *Brachystemma calycinum* para artrosis**

30 Prioridad:

**28.12.2004 US 23817**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.11.2013**

73 Titular/es:

**VITA GREEN HEALTH PRODUCTS CO., LTD.**  
**(100.0%)**  
**Workshops 3-7, 15/F., Oceanic Industrial Centre**  
**No. 2 Lee Lok Street Ap Lei Chau**  
**Hong Kong, HK**

72 Inventor/es:

**CHAN, HEI LING HELEN**

74 Agente/Representante:

**GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro**

**ES 2 428 114 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

Extracto de *Brachystemma calycinum* para artrosis.

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, en general, al campo de los suplementos dietéticos y beneficiosos para la salud sin receta y productos botánicos. En particular, la presente invención se refiere a un extracto de hierbas para la mejoría o el tratamiento del dolor o la incomodidad debidos a, o asociados con, artrosis.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las referencias que se mencionan en la presente descripción no son necesariamente técnica anterior y, por lo tanto, su mención no constituye una admisión de que dichas referencias sean técnica anterior en jurisdicción alguna.

15 La hierba *Brachystemma calycinum* D. Don (*B. calycinum*) es una planta indígena del sudoeste de China, el Himalaya y su rango de hábitat se extiende hasta el sudeste de Asia. En China, la hierba es conocida como "duanfanhua". La hierba es relativamente desconocida por la comunidad científica y se ha publicado muy poco sobre ella aparte de la bibliografía de sistemática y taxonomía vegetal.

En 2001, se publicó un artículo que describía cuatro péptidos cíclicos secundarios aislados a partir de extractos etanólicos de esta planta (Cheng *et al*). En 2002, Cheng *et al* aislaron cinco compuestos que contenían nitrógeno a partir de un extracto etanólico de la hierba. También fueron aislados cinco nuevos alcaloides a partir de las raíces de la hierba por Cheng *et al*.

20 Es un objeto de la presente invención enseñar un uso para el extracto de esta hierba.

## RESUMEN DE LA INVENCION

25 Se desvela el método de preparación del extracto de la hierba *Brachystemma calycinum*. El método de la presente invención comprende, generalmente, proporcionar la hierba, acidificar la hierba en un ácido adecuado, realizar la decocción de la hierba en un líquido adecuado, filtrar la decocción y concentrar la decocción para obtener el extracto de hierbas que es el segundo aspecto de la presente invención.

30 También se desvela proporcionar la hierba seca, acidificar la hierba seca empapándola en vinagre de arroz, calentar la hierba empapada en ácido hasta sequedad y realizar la decocción de la hierba en agua con hueso animal, preferentemente hueso de cerdo, repetir la decocción, combinar los filtrados de estas dos decocciones y concentrar los filtrados para formar un extracto. El extracto de hierbas puede procesarse adicionalmente a continuación para hacerlo más adecuado para administración oral.

Se desvela, además, la aplicación de una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto de *Brachystemma calycinum* preparado mediante el método que se enseña para la mejoría de lesión articular e incomodidad debida a, o asociada con, artrosis. Esta aplicación puede ser para profilaxis o para terapia del malestar.

35 La presente invención es el uso de un extracto de *Brachystemma calycinum* en la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de la artrosis.

También se desvela una formulación para el tratamiento de la artrosis, comprendiendo la formulación un extracto de la hierba acidificada *Brachystemma calycinum*.

La presente invención también puede usarse como suplemento dietético o nutricional.

## BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

40 La figura 1 es el cromatograma de HPLC para el extracto preparado en forma de una muestra acuosa para análisis por HPLC.

La figura 2 es el cromatograma de HPLC para el extracto preparado en forma de una muestra etanólica para análisis por HPLC.

45 La figura 3 es el cromatograma de HPLC a una resolución para el extracto calentado a reflujo con acetato de etilo para análisis por HPLC.

La figura 4 es el cromatograma de la figura 3 mostrado a otra resolución.

## DESCRIPCION DETALLADA

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las expresiones "comprenden", "comprende" y "que comprende" significan "incluyendo, aunque sin limitarse necesariamente a". Por ejemplo, para un método, aparato, molécula u otro artículo que contiene A, B, y C puede decirse con exactitud que comprende A y B. Del mismo modo, un método, aparato, molécula u otro artículo que "comprende A y B" también puede incluir cualquier número de etapas, componentes, átomos u otros artículos adicionales.

Además, a no ser que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia de la Medicina Tradicional China (MTC) a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse cualesquiera métodos o materiales similares a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, solamente se describe la realización preferida. Utilizando la descripción a continuación, un experto en la materia de la preparación y el uso de la fitomedicina china puede poner en práctica con facilidad los métodos de la invención reivindicada.

Aunque en la fitomedicina china, se usa y se prefiere tradicionalmente material seco, debe admitirse que el secado de los materiales vegetales facilita su almacenamiento, transporte y posterior procesamiento. El secado puede no ser un requisito para obtener los beneficios de estas hierbas. Como tal, se entiende que la presente invención también puede ponerse en práctica con la cantidad correspondiente del material vegetal fresco. El uso de material vegetal fresco, suficiente para alcanzar la cantidad y las proporciones requeridas del extracto usado, está dentro del alcance de las presentes reivindicaciones.

Un experto en la materia apreciará que es posible, con técnicas de cultivo de células y tejido vegetales, cultivar las células y tejidos de esta hierba *in vitro* y extraer cualesquiera componentes activos de interés de estas células y tejido. Por lo tanto, aunque la extracción de componentes activos a partir de partes secas de la planta es preferible y se enseña, la extracción de estos componentes de esta hierba a partir de células y tejido de la planta en cultivo permanece dentro del alcance y espíritu de las presentes reivindicaciones.

Las técnicas enseñadas incluyen reducir el tamaño del material vegetal durante el procesamiento. En este caso, en proceso de reducción puede conseguirse mediante una serie de maneras incluyendo, aunque sin limitarse a, corte, picado, molido, machacado, pulverización, maceración, molienda y trituración. Aunque puede enseñarse una manera preferida, también pueden usarse otras maneras y medios para conseguir una reducción del tamaño de los materiales.

Lo siguiente es un ejemplo de cómo puede ponerse en práctica la presente invención.

### **Suministro de la hierba**

Para su uso de acuerdo con la presente invención, la hierba *Brachystemma calycinum* (en lo sucesivo en el presente documento denominada *B. calycinum*) se recoge habitualmente en la provincia de Yunnan de China, principalmente en primavera y en verano, y se limpia de tierra y otro material extraño, se lava y a continuación se seca. La hierba puede reducirse de tamaño de forma manual o mecánica hasta pedazos de aproximadamente 10-15 mm de largo (por ejemplo, cortando o picando) para facilitar el secado. El secado de la hierba puede realizarse al sol o en un horno a temperatura controlada, pero la hierba se seca preferentemente a la sombra. El suministro de aire forzado puede acelerar el secado de la hierba. La hierba se seca hasta que su contenido de humedad es inferior al 10%. Seguidamente, la hierba puede triturarse adicionalmente, si se desea.

### **Acidificación de la hierba**

Para realizar la extracción, 100 kg de la hierba triturada seca (tanto partes aéreas como subterráneas) se empapan con 25 kg de vinagre de arroz chino en un recipiente resistente al ácido adecuado, es decir, una relación de hierba con respecto a vinagre de 5:1 en peso. El valor de pH del vinagre de arroz chino típicamente varía entre 2,0 y 4,0. Es importante asegurarse de que toda la masa de hierba seca se empapa uniformemente con el vinagre. Seguidamente, la mezcla de hierba y vinagre se calienta a no más de 60°C, preferentemente en el intervalo de temperatura de entre 50-60°C, hasta que el líquido del ácido se haya evaporado completamente y la hierba esté de nuevo sustancialmente seca. Esto requiere típicamente un día y la mezcla de hierba y vinagre se agita y se hace girar continuamente durante todo este tiempo para garantizar el calentamiento y secado uniforme de la masa de hierba. Típicamente, pueden obtenerse aproximadamente 100 kg de hierba acidificada a partir de esta etapa. Para obtener mayores cantidades, las cantidades de hierba y vinagre pueden aumentarse de forma consecuente o el proceso anterior puede repetirse, según sea necesario.

### **Decocción**

Seguidamente, 750 kg de la hierba acidificada se transfieren a un percolador (Percolador Multifunción, Modelo NO TQX3, Changshou City Chemical Engineering Machine Manufacturing, Provincia de Jiangsu, China) para la decocción. A esta cantidad de hierba acidificada seca triturada, se le añaden 300 kg de hueso de cerdo (preferentemente los huesos anchos de la pelvis y huesos largos lavados, limpiados, drenados y picados o aplastados), para conseguir una relación de hierba acidificada con respecto a hueso de 2,5:1 en peso. El contenido

se extiende a continuación uniformemente en el fondo del percolador antes de añadir 10.500 l de agua, es decir, una relación de agua con respecto a sólido de 10:1 en peso. Se deja reposar al contenido durante 1 h antes de que la temperatura se eleve a entre 90-95°C. El contenido se hierve a fuego lento en este intervalo de temperatura con el líquido agitado o circulante durante aproximadamente 90 minutos. En ningún momento se deja que el contenido llegue a ebullición. El líquido en el percolador se decanta y se filtra a continuación como un primer filtrado. La filtración se realiza a través de tamices sucesivos de mallas cada vez más finas hasta que el filtrado está sustancialmente libre de partículas visibles.

Seguidamente, se añaden a continuación 8.400 l de agua al residuo sólido (una relación de agua con respecto a líquido de 8:1 en peso) en el percolador y el contenido se hierve a fuego lento de nuevo a entre 90-95°C durante otros 60 minutos con el líquido agitado o en circulación. De nuevo, el líquido en el percolador se decanta y se filtra como anteriormente para obtener un segundo filtrado. El primer y segundo filtrados se combinan a continuación como la decocción de la presente invención.

#### Concentración de la decocción

La decocción se concentra a continuación (Concentrador de Alta Eficacia, Modelo NO 941, Hunan Energy-Saving Equipment Manufacturing, Provincia de Hunan, China) a una presión rebajada de 0,06-0,075 MPa por debajo de la presión atmosférica estándar y temperatura a o por debajo de 65°C hasta que se obtiene un extracto con una densidad relativa que está entre 1,20 y 1,30, tal como se determina mediante muestreo periódico de la decocción durante el proceso de concentración.

#### Secado por atomización del extracto líquido

Aunque el extracto puede secarse a continuación mediante una serie de métodos tales como secado al vacío, preferentemente se seca por atomización para formar un polvo. La temperatura de entrada se ajusta a 200-220°C y la temperatura de salida es de 80-100°C. Este polvo puede tamizarse además a través de un tamiz de malla 80. Aproximadamente 100 kg de extracto pueden obtenerse a partir de las cantidades indicadas usadas mediante este proceso. El extracto obtenido de este modo es altamente higroscópico. Se almacena en un recipiente hermético al aire, preferentemente con un desecante adecuado y a baja temperatura (aproximadamente 4°C) o se procesa inmediatamente tal como se enseña a continuación. El extracto puede procesarse o transformarse adicionalmente en una forma adecuada para el envasado, almacenamiento o administración oral.

#### Caracterización del extracto mediante HPLC

El extracto de la presente invención, tal como se obtiene mediante el proceso anterior, se sometió a análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Para ello, 2,0 g del extracto se llevaron a reflujó con 30 ml de agua, etanol al 95% o acetato de etilo por separado durante una hora, se filtraron y a continuación se evaporaron a sequedad. A los tres residuos obtenidos de este modo, se les añadieron 10 ml de metanol para formar tres muestras para análisis en un sistema de HPLC Shimadzu.

La columna de cromatografía era de 150 mm de largo y la matriz era octadecilsilano con sílice unida químicamente como carga. La fase móvil usada era una mezcla de acetonitrilo-agua en una relación de 30:70; el caudal de la bomba era de 1 ml/minuto y la temperatura de la columna se mantuvo a 40°C. La detección de la muestra era a 254 nm. Los cromatogramas obtenidos para el extracto obtenido mediante extracción con los tres disolventes diferentes de agua, etanol y acetato de etilo se proporcionan en las figuras 1 a 4.

Los perfiles de elución de los componentes detectables de la invención del extracto de hierbas mediante agua, etanol y acetato de etilo mostrados como los cromatogramas en las figuras 1 a 4 son típicos y característicos para el proceso de la presente invención. Los perfiles de elución pueden compararse o alinearse visualmente mediante un software adecuado para el análisis del control de calidad.

#### Control de calidad usando TLC

La calidad del extracto de la presente invención puede evaluarse comparando componentes prominentes de la hierba *B. calycinum* con los de la invención mediante análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de la siguiente manera.

A 5 g del extracto para su uso de acuerdo con la presente invención se le añadieron 50 ml de etanol. La mezcla se sonicó durante 30 minutos, se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad para obtener un residuo. Este residuo se disolvió en 50 ml de agua y se extrajo tres veces con alcohol n-butílico saturado en agua (20 ml, 15 ml y 10 ml respectivamente). Las capas orgánicas se retiraron a continuación, se mezclaron y se extrajeron de nuevo con agua saturada en n-butílico (20 ml, 15 ml y 10 ml respectivamente) y se dejó que las capas orgánicas mezcladas se evaporaran a sequedad para formar un segundo residuo. Se añadieron dos ml de metanol para disolver este residuo y la solución resultante formaba la solución de estudio.

La solución de referencia se obtuvo añadiendo 100 ml de agua a 10 g de hierba seca cuyo tamaño se había

reducido hasta un polvo. El polvo de hierba se extrajo a reflujo y se calentó durante una hora. La mezcla se filtró a continuación y se evaporó a sequedad para obtener un residuo. A continuación, se añadieron 100 ml de etanol para disolver el residuo y la mezcla se sonicó durante 30 minutos y se filtró. El filtrado se evaporó a sequedad y a continuación se disolvió en 50 ml de agua. Esta solución se extrajo a continuación con alcohol n-butílico saturado en agua (20 ml, 15 ml y 10 ml respectivamente). Las capas orgánicas se retiraron, se mezclaron y se extrajeron de nuevo con agua saturada en n-butilo (20 ml, 15 ml y 10 ml respectivamente). Se dejó que las capas orgánicas mezcladas de esta segunda extracción se evaporaran a sequedad para formar otro residuo. Se añadieron dos ml de metanol para disolver este residuo y la solución resultante formaba la solución de referencia.

Seguidamente, 50  $\mu$ l de cada una de las soluciones de estudio y referencia se colocaron en una placa de gel de sílice G. La separación de los componentes principales se realizó usando éter de petróleo:formiato de etilo:ácido fórmico:agua (25:5:0,5:0,5) como fase móvil a 30-60°C. Después de secar al aire, el cromatograma se visualizó en luz ultravioleta (254 nm y 365 nm). Pueden observarse puntos fluorescentes verde-amarillos con los mismos valores de Rf para ambas soluciones, lo que indicaba que los componentes principales estaban presentes para las dos soluciones.

### 15 **Procesamiento adicional opcional del extracto**

Para el procesamiento o la preparación para administración oral, la forma preferida del extracto es una cápsula con excipientes adecuados. En una implementación, dextrina, almidón soluble y aspartamo como excipientes se mezclan con el extracto de hierba en un mezclador. Se añade etanol líquido suficiente (75%) como aglutinante. Esta mezcla se mezcla bien y a continuación se seca al vacío en un secador (Secador al Vacío Modelo N° FZGX15-00, Wuhan Pharmaceutical Machinery Manufacturing, Provincia de Hunan, China).

La mezcla se granula a continuación pulverizando en un (Granulador Húmedo Modelo NO GH1-120, China Harbin High Technology Company, Provincia de Heilongjiang, China) a través de tamices de número de apertura 80 para obtener un polvo fino. Puede añadirse polvo de talco para mejorar la fluidez antes de que se llenen cápsulas de tamaño 1 con el polvo del extracto para administración oral. El extracto no envasado se usó para los estudios animales mientras que el extracto en cápsulas se administraba a pacientes humanos para las observaciones clínicas descritas a continuación.

En otra implementación, el extracto obtenido a partir de la primera implementación se mezcla adicionalmente con uno o más ingredientes para obtener una formulación. Estos ingredientes pueden comprender las hierbas chinas *Ganoderma*, *Radix Angelicae Pubescentis*, *Poria* y *Radix Gentianae Macrophyllae*.

### 30 **Estudios animales**

Los siguientes estudios en ratas midieron parámetros tales como aumento de peso, apetito, hemograma de ensayo (células y marcadores bioquímicos), cambio de peso visceral, así como observaciones a partir de examen patológico e histológico.

#### **Animales**

35 Ratas Sprague-Dawley sanas de ambos sexos de entre 57-72 g se obtuvieron del *Guangdong Provincial Medical Experiment Animal Center*. Los animales se alimentaron con alimento en grano convencional suministrado por su centro de origen.

#### **Diseño experimental**

40 Los animales sanos se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos de 15 animales macho y 15 animales hembra. En los grupos, los animales se segregaron en jaulas separadas por género. Estos cuatro grupos eran de control (agua destilada), dosis baja (1,51 g/kg de peso corporal), dosis media (3,01 g/kg de peso corporal) y dosis alta (6,03 g/kg de peso corporal). Estas dosis son el equivalente de 12,5x, 25x y 50x la dosis clínica para seres humanos por área superficial y 66,6x, 133,3x y 266,7x en peso. La dosis clínica humana era el equivalente de tres cápsulas al día o 1,35 g.

45 Durante un periodo de 90 días, estos 120 animales se alimentaron con agua destilada o la dosis del extracto de hierbas en agua mediante alimentación forzada diariamente de acuerdo con su grupo experimental. Cada semana, los animales se pesaron individualmente y se observó la cantidad de alimento consumido. Las dosis se ajustaron a continuación de forma consecuente para administrar 1,0 ml de extracto por 100 g de peso corporal.

50 Después de 90 días, 10 machos y 10 hembras de cada grupo se sacrificaron para el análisis mientras que los tratamientos experimentales y de control (según sea aplicable) se interrumpieron para todos los demás animales durante un periodo de recuperación de 30 días.

#### **Observaciones generales**

Durante los periodos experimental y de recuperación, se observaron el apetito de los animales, la actividad general y

las heces.

#### Datos experimentales y observaciones

##### Utilización del alimento

5 El aumento de peso neto medio, la ingestión de alimento total y la tasa de utilización de alimento durante el periodo de administración de 90 días se dan en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1 Aumento de peso neto, ingestión de alimento total y tasa de utilización de alimento durante el periodo de administración ( $x \pm s$ ,  $n=15$ )

Sexo	Dosis (g/kg)	Aumento de peso neto (g/rata)	Ingestión alimento (g/rata)	de total	Utilización alimento (%)	de
Macho	0,00	455,4±46,3	2412,7±35,6		20,6±11,5	
	1,51	436,5±45,6	2385,8±34,7		19,8±12,1	
	3,01	409,0±39,4	2243,3±27,5		19,5±11,5	
	6,03	390,0±37,7	2211,3±28,4		19,0±11,4	
Hembra	0,00	251,9±34,7	1988,7±30,7		14,1±12,9	
	1,51	256,4±25,5	1986,7±24,2		14,1±11,0	
	3,01	254,7±33,7	1901,8±28,2		14,6±11,1	
	6,03	248,1±24,4	1687,9±14,3		14,7±11,6	

10 El aumento de peso neto medio, la ingestión de alimento total y la tasa de utilización de alimento durante el periodo de recuperación de 30 días se dan en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2 Aumento de peso neto medio, ingestión de alimento total y tasa de utilización de alimento durante el periodo de recuperación de 30 días ( $x \pm s$ ,  $n=5$ )

Sexo	Dosis (g/kg)	Aumento de peso neto (g/rata)	Ingestión alimento (g/rata)	de total	Utilización alimento (%)	de
Macho	0,00	75,4±12,9	1524,4±58,4		4,7±3,5	
	1,51	81,2±41,2	1569,6±63,5		5,2±2,5	
	3,01	82,0±50,8	1564,0±81,5		5,2±1,8	
	6,03	65,4±23,8	1487,8±76,1		4,1±2,9	
Hembra	0,00	18,6±17,2	961,0±50,3		2,0±1,0	
	1,51	20,4±18,4	1021,0±55,3		2,1±0,8	
	3,01	20,6±7,4	1041,3±56,7		1,9±0,8	
	6,03	16,2±3,7	952,6±52,8		1,8±1,4	

##### Hemograma

15 Después del periodo de administración y del periodo de recuperación, se realizó un ensayo sanguíneo en un panel de marcadores comunes. La sangre extraída se analizó mediante un analizador de células sanguíneas Beckman 5dif. El panel de marcadores comprendía recuento de leucocitos (WBC), clasificación de leucocitos, recuento de eritrocitos (RBC), determinación de hemoglobina (Hb), recuentos de plaquetas (PLT) y hematocrito (HCT). Los resultados para el final del periodo de administración se dan en la Tabla 3 y al final del periodo de recuperación en la Tabla 4, respectivamente.

20

Tabla 3 Marcadores sanguíneos durante el periodo de administración ( $x \pm s$ ,  $n=10$ )

Sexo	Dosis (g/kg)	WBC ( $\times 10^9/l$ )	RBC ( $\times 10^{12}/l$ )	Hb (g/l)	PLT ( $\times 10^9/l$ )	HCT (l/l)
Macho	0,00	9,9 $\pm$ 3,7	8,6 $\pm$ 0,5	158,4 $\pm$ 8,4	693 $\pm$ 90	0,47 $\pm$ 0,02
	1,51	11,4 $\pm$ 3,1	7,7 $\pm$ 2,8	161,6 $\pm$ 19,8	724 $\pm$ 108	0,48 $\pm$ 0,01
	3,01	12,0 $\pm$ 2,1	8,4 $\pm$ 0,3	153,0 $\pm$ 4,9	737 $\pm$ 125	0,45 $\pm$ 0,01
	6,03	9,9 $\pm$ 1,5	7,8 $\pm$ 1,4	146,4 $\pm$ 5,2	697 $\pm$ 93	0,44 $\pm$ 0,02
Hembra	0,00	6,4 $\pm$ 1,1	8,3 $\pm$ 0,5	158,5 $\pm$ 6,5	770 $\pm$ 106	0,46 $\pm$ 0,42
	1,51	7,2 $\pm$ 1,4	8,2 $\pm$ 0,2	154,2 $\pm$ 5,8	786 $\pm$ 95	0,44 $\pm$ 0,02
	3,01	8,5 $\pm$ 2,8	7,7 $\pm$ 0,4	148,9 $\pm$ 6,2	711 $\pm$ 121	0,44 $\pm$ 0,02
	6,03	7,3 $\pm$ 2,0	7,8 $\pm$ 0,9	148,9 $\pm$ 11,3	736 $\pm$ 161	0,45 $\pm$ 0,04

Tabla 4 Marcadores sanguíneos durante el periodo de recuperación ( $x \pm s$ ,  $n=5$ )

Sexo	Dosis (g/kg)	WBC ( $\times 10^9/l$ )	RBC ( $\times 10^{12}/l$ )	Hb (g/l)	PLT ( $\times 10^9/l$ )	HCT (l/l)
Macho	0,00	10,8 $\pm$ 3,0	8,5 $\pm$ 1,1	159,5 $\pm$ 10,8	766 $\pm$ 89	0,43 $\pm$ 0,03
	1,51	10,5 $\pm$ 1,2	8,8 $\pm$ 0,1	163,1 $\pm$ 3,4	740 $\pm$ 48	0,45 $\pm$ 0,01
	3,01	12,0 $\pm$ 2,2	9,2 $\pm$ 0,2	162,4 $\pm$ 3,8	911 $\pm$ 60	0,44 $\pm$ 0,01
	6,03	9,8 $\pm$ 2,8	8,8 $\pm$ 0,2	162,9 $\pm$ 3,9	757 $\pm$ 68	0,44 $\pm$ 0,01
Hembra	0,00	7,3 $\pm$ 2,6	8,2 $\pm$ 0,6	152,8 $\pm$ 5,0	770 $\pm$ 106	0,41 $\pm$ 0,01
	1,51	6,6 $\pm$ 0,5	8,4 $\pm$ 0,5	158,5 $\pm$ 6,2	786 $\pm$ 95	0,42 $\pm$ 0,02
	3,01	6,8 $\pm$ 2,9	8,0 $\pm$ 0,9	153,6 $\pm$ 16,8	711 $\pm$ 121	0,40 $\pm$ 0,04
	6,03	8,3 $\pm$ 1,80	8,0 $\pm$ 0,4	149,5 $\pm$ 10,7	736 $\pm$ 161	0,40 $\pm$ 0,03

## 5 Bioquímica sanguínea

Los marcadores bioquímicos sanguíneos medidos incluyen alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), nitrógeno de urea en sangre (BUN), creatina (Crea), proteína total (TP), albúmina (ALB), colesterol total (T-cho), glucosa en sangre (GLu), fosfatasa alcalina (ALP), bilirrubina total (TBIL). Estos marcadores se examinaron usando un instrumento de análisis biológico automático Beckman CX5. Los datos se muestran en la

10

Tabla 5 Marcadores bioquímicos sanguíneos durante el periodo de administración ( $x \pm s$ )

Sexo	Dosis (g/kg)	ALT (u/l)	AST (u/l)	BUN (mmol/l)	TP (g/l)	ALB (g/l)	Crea ( $\mu$ mol/l)
Macho	0,00	70,9 $\pm$ 7,7	218,5 $\pm$ 36,3	9,0 $\pm$ 0,5	74,2 $\pm$ 3,4	37,0 $\pm$ 1,4	104,0 $\pm$ 22,2
	1,51	71,2 $\pm$ 9,7	184,9 $\pm$ 29,6	8,0 $\pm$ 0,5	72,6 $\pm$ 4,2	36,9 $\pm$ 2,0	97,5 $\pm$ 32,3
	3,01	71,7 $\pm$ 10,7	193,1 $\pm$ 34,2	7,5 $\pm$ 0,6	76,4 $\pm$ 3,2	36,4 $\pm$ 0,8	78,5 $\pm$ 32,0
	6,03	69,7 $\pm$ 8,4	202,3 $\pm$ 31,7	7,7 $\pm$ 0,6	75,6 $\pm$ 3,3	37,3 $\pm$ 1,0	87,3 $\pm$ 31,2
Hembra	0,00	71,7 $\pm$ 8,4	199,3 $\pm$ 38,6	9,8 $\pm$ 2,1	74,6 $\pm$ 5,0	37,1 $\pm$ 3,0	116,6 $\pm$ 33,4
	1,51	66,5 $\pm$ 7,4	172,1 $\pm$ 30,4	9,0 $\pm$ 1,2	78,7 $\pm$ 6,1	39,0 $\pm$ 1,8	96,6 $\pm$ 33,6
	3,01	71,4 $\pm$ 7,4	168,4 $\pm$ 24,4	8,4 $\pm$ 1,2	79,5 $\pm$ 4,3	38,7 $\pm$ 1,6	115,6 $\pm$ 16,8

	6,03	63,9±8,0	201,6±26,2	8,0±1,0	81,3±4,0	39,2±1,7	96,9±17,4
--	------	----------	------------	---------	----------	----------	-----------

Tabla 6 Marcadores bioquímicos sanguíneos durante el periodo de recuperación (x ± s)

Sexo	Dosis (g/kg)	Tcho (mmol/l)	Glu (mmol/l)	ALP (IU/l)	TBIL (μmol/l)
Macho	0,00	1,5±0,3	6,6±0,6	235,1±34,4	34,8±7,4
	1,51	1,6±0,3	6,3±0,5	223,6±37,7	34,9±14,3
	3,01	1,5±0,2	7,4±1,0	241,7±28,0	25,8±14,9
	6,03	1,4±0,2	7,8±1,0	229,9±25,8	45,3±20,8
Hembra	0,00	1,6±0,4	7,8±1,3	216,6±54,6	22,7±7,0
	1,51	1,7±0,2	7,1±0,7	216,9±50,6	25,0±4,4
	3,01	2,1±0,2	7,3±0,6	226,7±49,0	24,9±11,2
	6,03	1,8±0,3	7,6±0,6	205,0±39,0	31,1±8,3

**Examen de las vísceras**

- 5 Al final de cada periodo (administración y recuperación), los animales fueron sacrificados y los órganos (hígado, riñón, corazón, pulmón, bazo, cerebro, glándula adrenal, glándula prostática y testículo o útero) se extirparon, se pesaron y se examinaron en busca de cualquier signo de patología manifiesta. Los órganos y sus pesos se dan en la Tabla 7 para el periodo de administración y en la Tabla 8 para el periodo de recuperación.

Tabla 7 Peso de las vísceras al final del periodo de administración (g, x ± s, n=10)

Sexo	Dosis (g/kg)	Corazón	Hígado	Bazo	Pulmón	Riñón
Macho	0,00	1,59±0,23	17,6±1,9	0,83±0,16	2,29±0,66	2,97±0,40
	1,51	1,50±0,19	17,2±2,3	0,96±0,12	2,46±0,48	2,93±0,30
	3,01	1,55±0,19	15,4±1,9	0,87±0,19	2,53±0,64	3,00±0,32
	6,03	1,49±0,19	16,4±1,3	0,88±0,15	2,35±0,37	3,10±0,35
Hembra	0,00	1,09±0,10	9,6±1,7	0,59±0,11	1,91±0,25	1,99±0,23
	1,51	1,06±0,08	10,2±1,0	0,62±0,11	1,86±0,32	2,03±0,20
	3,01	1,10±0,19	10,1±1,7	0,79±0,28	1,90±0,27	1,97±0,23
	6,03	1,05±0,11	3,22±1,0	0,66±0,10	1,92±0,39	2,09±0,16
Sexo	Dosis (g/kg)	Cerebro	Glándula adrenal	Glándula prostática	Testículo	Útero
Macho	0,00	1,96±0,16	0,10±0,03	0,62±0,12	3,54±0,18	
	1,51	1,94±0,14	0,10±0,02	0,68±0,20	3,52±0,29	
	3,01	2,00±0,20	0,10±0,03	0,66±0,20	3,52±0,30	
	6,03	1,97±0,13	0,10±0,04	0,66±0,22	3,59±0,35	
Hembra	0,00	1,65±0,27	0,12±0,03			0,22±0,09
	1,51	1,63±0,34	0,10±0,02			0,18±0,08
	3,01	1,89±0,11	0,10±0,02			0,20±0,07



	6,03	1,91±0,10	0,11±0,03			0,23±0,09
--	------	-----------	-----------	--	--	-----------

Tabla 8 Peso de las vísceras al final del periodo de recuperación (g, x ± s, n=5)

Sexo	Dosis (g/kg)	Corazón	Hígado	Bazo	Pulmón	Riñón
<b>Macho</b>	0,00	1,65±0,22	20,5±5,7	1,09±0,92	2,52±1,10	3,08±0,62
	1,51	1,67±0,30	20,3±5,2	0,89±0,14	2,44±0,59	3,22±0,64
	3,01	1,48±0,18	18,6±3,2	1,02±0,24	2,51±0,46	3,10±0,35
	6,03	1,53±0,05	17,5±1,4	0,98±0,10	2,26±0,54	2,64±0,11
<b>Hembra</b>	0,00	1,02±0,16	11,2±1,6	0,72±0,19	1,96±0,70	1,87±0,27
	1,51	1,09±0,14	12,2±1,1	0,71±0,09	2,24±0,61	2,01±0,06
	3,01	1,13±0,08	11,9±0,4	0,99±0,40	1,84±0,14	2,20±0,16
	6,03	0,98±0,08	10,1±0,4	0,72±0,10	1,72±0,28	2,01±0,22
Sexo	Dosis (g/kg)	Cerebro	Glándula adrenal	Glándula prostática	Testículo	Útero
<b>Macho</b>	0,00	2,04±0,32	0,08±0,02	1,15±0,08	3,65±0,22	
	1,51	2,03±0,28	0,07±0,03	0,97±0,06	3,88±0,20	
	3,01	1,84±0,27	0,09±0,04	0,76±0,34	3,69±0,37	
	6,03	1,81±0,29	0,08±0,02	1,09±0,27	3,33±0,50	
<b>Hembra</b>	0,00	1,65±0,27	0,13±0,04			0,21±0,06
	1,51	1,63±0,34	0,09±0,02			0,21±0,04
	3,01	1,89±0,11	0,08±0,01			0,18±0,04
	6,03	1,91±0,10	0,09±0,02			0,24±0,15

### Histología

5 Después de un examen visual grosero, se procesaron tejidos de los órganos de animales en los grupos de control y de dosis alta, mediante técnicas histológicas convencionales para examen microscópico. Los tejidos de los órganos se fijaron en formalina, se incluyeron en parafina, se seccionaron con un microtomo y se montaron sobre portaobjetos de vidrio, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) antes de examinarlos. No se observó ninguna patología patente a simple vista. Como tales, solamente muestras histológicas de los grupos de control y de dosis 10 alta se sometieron a examen al microscopio. Las observaciones son las siguientes.

**Hígado:** Se observó al microscopio que la membrana hepática estaba intacta, sin aumento de grosor. No se observaron degeneración hidrópica, cambio graso ni necrosis en los hepatocitos. No se observó colestasis en los hepatocitos ni en el conducto biliar. No se observó dilatación del esfínter ni exudación.

15 **Riñón:** La estructura de los glomérulos estaba claramente intacta, sin edema obvio, atrofia ni fibrosis. No se observó edema obvio en los túbulos distales y proximales, ni cambio graso, cambio hialino ni necrosis. La membrana basal estaba intacta. No se observaron cilindros en los tubos colectores.

20 **Corazón:** El pericardio estaba intacto, sin hiperplasia del tejido conjuntivo. No se observó hiperplasia o atrofia de las fibras de miocardio. Las fibras de miocardio estaban dispuestas correctamente sin rotura, necrosis o cicatrización. No se descubrió ningún edema en las células de miocardio. Las células endocárdicas estaban intactas, sin cambios de infarto o evidencias de trombos.

**Bazo:** No se observó hiperplasia del tejido conjuntivo fibroso en la membrana del bazo ni en los cordones esplénicos. Sin infiltración celular inflamatoria obvia, sin hiperplasia reactiva en los senos esplénicos. No se

observaron exudados de sangre estancada ni células inflamatorias en la pulpa roja.

**Cerebro:** No se observó infiltración en la superficie del cerebro. La estructura de la materia blanca y gris estaba clara. Las neuronas no habían cambiado ni se habían vuelto necróticas. No se descubrió hemorragia, inflamación ni anomalía en los intersticios.

5 **Estómago e intestinos:** La superficie de la membrana mucosa era lisa, y el color era normal. No se descubrió exudado anormal, hemorragia, necrosis o ulceración. La estructura de los intestinos y del estómago estaba intacta, y la mucosa superficial de la membrana gástrica estaba intacta. Las glándulas estaban dispuestas correctamente. No se descubrió desprendimiento epitelial, necrosis o úlcera. No se descubrieron cambios patológicos anormales, como hiperemia o edema en la submucosa.

10 **Testículo:** La membrana blanca externa estaba intacta. El lóbulo y los cordones del epidídimo estaban dispuestos radialmente. No se descubrió atrofia o desprendimiento en las células de soporte en los cordones, los espermatoblastos primarios; espermatoblastos secundarios o espermatocitos.

15 **Glándula prostática:** La estructura del tejido glandular prostático era normal. El epitelio glandular estaba dispuesto correctamente. No se observó necrosis en el epitelio. No se observaron cálculos en la cavidad de la glándula. No se observó hiperplasia de los intersticios. No se observó infiltración de células inflamatorias.

**Ovario:** Se observaron folículos ováricos primarios, folículos ováricos secundarios y folículos primarios bien estructurados en el tejido ovárico. La epidermis estaba intacta, sin ninguna obstrucción o putrescencia presente. **Útero:** Al microscopio, las glándulas endometriales uterinas y los intersticios eran normales y la estructura miometrial era normal, sin hemorragia ni otro cambio anormal.

20 **Glándula tiroidea:** Al microscopio, la estructura folicular de la glándula tiroidea era normal, sin deposición similar a la coloidal.

**Timo:** Al microscopio, la estructura del timo era normal, sin ningún cambio patológico inusual.

**Glándula adrenal:** No se observó cambio pleomórfico o necrosis en la zona glomerulosa, células reticulares en la corteza. Sin cambios patológicos en las células de la médula.

25 **Ganglios linfáticos:** Al microscopio, la corteza y la médula de los ganglios linfáticos eran normales sin cambios inusuales.

### Observaciones

30 A partir de lo anterior, durante los periodos de administración (estudio) y recuperación, en comparación con el grupo de control, los principales órganos de los diferentes grupos de animales (corazón, hígado, pulmón, bazo, riñón, cerebro, estómago, intestinos, timo, glándula tiroidea, páncreas, glándula adrenal, ganglios linfáticos, testículo, glándula prostática, ovario y útero) eran normales, sin cambios patológicos obvios.

35 A partir de los datos experimentales anteriores, se demostró que el extracto de hierbas para uso de acuerdo con la presente invención no tiene efecto adverso alguno sobre los animales. A partir de la semana 10, las ratas macho en los grupos de dosis media y alta ganaron peso de forma más lenta. Esta diferencia era estadísticamente significativa en comparación con el grupo de control ( $p \leq 0,05$ ). No había otras diferencias significativas entre los grupos experimental y de control en los demás índices, tales como los parámetros hematológicos, los parámetros bioquímicos y las observaciones patológicas. No se observaron reacciones tóxicas agudas o crónicas.

### Observaciones clínicas

40 El extracto para uso de acuerdo con la presente invención envasado en cápsulas descritas anteriormente, se administró a pacientes que se quejaban de problemas en las articulaciones debido a artrosis, así como otras dolencias relacionadas con las articulaciones. Algunos ejemplos notables se incluyen a continuación para ilustrar la eficacia del extracto para aliviar los síntomas asociados con artrosis, y dolor y lesión de las articulaciones. La artrosis puede distinguirse de la artritis reumatoide de la siguiente manera.

### Artritis reumatoide

45 La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad multisistémica crónica de causa desconocida. El elemento característico de la AR es la sinovitis inflamatoria persistente, que habitualmente afecta a articulaciones periféricas en una distribución simétrica.

**Epidemiología y Genética:** Los estudios de familia indican una predisposición genética.

50 **Patología y Patogenia:** Constelación característica de elementos, que incluye hiperplasia e hipertrofia de las células del revestimiento sinovial; cambios vasculares focales o segmentarios, incluyendo lesión microvascular, trombosis y neovascularización; edema; e infiltración con células mononucleares. El sinovio reumatoide se caracteriza por la

producción local de citoquinas y quimioquinas inflamatorias que justifican muchos de los elementos de la sinovitis reumatoide, incluyendo la inflamación del tejido sinovial, inflamación del líquido sinovial, proliferación sinovial y daño al cartilago y al hueso, así como las manifestaciones sistémicas de AR.

- 5 **Manifestaciones Clínicas.** De forma característica, la AR es una poliartritis crónica especialmente las de las manos, muñecas, rodillas y pies. El dolor, la hinchazón y la sensibilidad inicialmente pueden localizarse mal en las articulaciones. La rigidez matinal es casi invariable. La mayoría de los pacientes experimentarán síntomas constitucionales tales como debilidad, facilidad para fatigarse, anorexia y pérdida de peso.

**Manifestaciones extra-articulares:** Éstas incluyen nódulos reumatoides, vasculitis reumatoide, manifestaciones pleuropulmonares, y síndrome de Felty.

- 10 **Descubrimientos de Laboratorio:** Factores reumatoides, autoanticuerpos se descubren en más de dos tercios de los adultos con la enfermedad. La tasa de sedimentación de los eritrocitos aumenta en casi todos los pacientes con AR activa. En los análisis del líquido sinovial predominan los leucocitos polimorfonucleares.

**Evolución clínica y Pronóstico:** La mayoría de los pacientes experimentan actividad de la enfermedad persistente aunque fluctuante.

- 15 **Tratamiento:** Habitualmente se prescriben fármacos antirreumáticos que modifican la enfermedad, terapia inmunosupresora y cirugía.

### Artrosis

- 20 La artrosis (ART) representa el fallo de la articulación diartrodial (móvil, con revestimiento sinovial). En ART idiopática (primaria), la forma más común de la enfermedad, ningún factor predisponente es evidente. La ART secundaria es patológicamente indistinguible de la ART idiopática pero atribuible a una causa subyacente que incluye traumatismo, factores metabólicos, endocrinos, etc.

- 25 **Epidemiología y Factores de Riesgo:** La ART es la enfermedad articular más común en seres humanos. La edad es el factor de riesgo más potente para ART. En las mujeres, de edades de 45 a 64 años, la prevalencia era del 30%. El traumatismo mayor y el uso repetitivo de la articulación también son factores de riesgo importantes para ART. La ART secundaria puede clasificarse como traumatismo, metabólica, endocrina, etc. La obesidad es un factor de riesgo para ART en la rodilla y ART en la mano. La ART es una enfermedad de un órgano, la articulación sinovial en áreas que soportan carga del cartilago articular. La superficie de la articulación adelgaza, el cartilago se ablanda, la integridad de la superficie se rompe, y de desarrollan fisuras verticales.

- 30 **Elementos Clínicos:** El dolor en la articulación causado por ART a menudo se describe con un dolor profundo y se localiza en la articulación afectada. Típicamente, el dolor causado por ART es agravado por el uso de la articulación y se alivia mediante reposo. La sensibilidad localizada y la hinchazón de tejido óseo y blando a menudo están presentes. El crépito óseo es característico.

- 35 **Descubrimientos de Laboratorio y Radiográfico:** El diagnóstico de ART es clínico y radiográfico, donde se observan estrechamiento del espacio articular, esclerosis ósea subcondral, quistes subcondrales y osteofitosis de forma singular o colectiva. Ningún estudio de laboratorio es diagnóstico para ART.

**Terapia de Fármacos de ART:** La terapia para ART actualmente es paliativa; ningún agente farmacológico ha demostrado prevenir, retardar el avance de, o invertir los cambios patológicos de ART en seres humanos.

Los siguientes son ejemplos de pacientes tratados con cápsulas de la preparación de hierbas de la presente invención.

- 40 **Paciente A (Ejemplo comparativo)**

Un paciente mujer de 17 años de edad tenía traumatismo en las extremidades inferiores y en las articulaciones con locomoción limitada de las rodillas. A la paciente se le prescribió una cápsula a tomar cada día durante cinco días. Se prescribieron Feldene e Hirudoid para los moratones. Su estado mejoró después de cinco días y se curó.

### Paciente B

- 45 A un paciente varón, de 85 años de edad, se le diagnosticó artrosis en ambas extremidades inferiores y tenía locomoción y movilidad limitadas acompañadas por dolor. Se le prescribió una cápsula dos veces al día. Después de 25 días, experimentó una significativa disminución del dolor y un aumento de la suavidad al caminar.

### Paciente C (Ejemplo comparativo)

- 50 Un paciente mujer, de 80 años de edad, tenía artritis grave en las dos rodillas. Se le prescribió una cápsula dos veces al día durante 23 días. Seguidamente, mostró una mejoría significativa al caminar y experimentó una disminución del dolor.

**Paciente D (Ejemplo comparativo)**

Un paciente varón, de 27 años de edad, se presentó con hinchazón del dedo y artritis de las articulaciones interfalángicas y el codo derecho. Se le prescribió la cápsula tres veces al día durante 30 días. Seguidamente, el paciente se recuperó completamente.

5 **Paciente E (Ejemplo comparativo)**

Otro paciente mujer de 17 años de edad se quejaba de múltiple hinchazón y interfalángica y dolor a diario. Se le prescribió una cápsula una vez cada dos semanas durante nueve meses. A continuación, los síntomas disminuyeron su frecuencia de episodios diarios a una vez cada dos semanas o así.

**Paciente F (Ejemplo comparativo)**

10 Un paciente varón, de 56 años de edad, tenía hinchazón y dolor articular de la primera articulación interfalángica. Se recuperó después de habersele prescrito dos cápsulas diarias durante dos meses.

**Paciente G (Ejemplo comparativo)**

15 A una paciente mujer, de 45 años de edad, se le diagnosticó artritis en su rodilla izquierda y dificultad al caminar. Se le prescribió una cápsula dos veces al día durante cuatro meses. Seguidamente, la dosificación se redujo a una cápsula a la semana durante un año. La paciente mostró una disminución de la hinchazón y el dolor y experimentó una recuperación total de la capacidad de caminar.

**Resumen de observaciones clínicas**

20 A partir de los ejemplos anteriores, puede verse que el extracto de hierbas es eficaz para el tratamiento de lesiones y dolor articulares en afecciones asociadas con artrosis y otras lesiones relacionadas. Aunque se observa eficacia en la aplicación del extracto para la terapia, se prevé que el extracto también pueda usarse para la profilaxis de estas dolencias.

25 Se sabe que la artrosis es una enfermedad para la que casi no existe tratamiento, la terapia para artrosis es paliativa y ningún agente farmacológico ha demostrado ser eficaz para prevenir o retardar el avance o invertir los cambios patológicos de artrosis en el ser humano. Dicho extracto de hierbas ha demostrado, a partir de los ejemplos anteriores, que es eficaz para aliviar los síntomas y el avance de la artrosis, así como para restaurar la función de pacientes afectados. Por lo tanto, puede preverse que este extracto de hierbas pueda ser capaz de prevenir la artrosis en individuos susceptibles, retardar la aparición de los síntomas clínicos en pacientes con evidencia radiológica o MRI de signos tempranos de artrosis, detener el avance de pacientes con artrosis clínica e invertir los cambios patológicos de la artrosis. Existen pruebas de que este extracto de hierbas también puede ser útil para  
30 pacientes que padecen artritis reumatoide no para detener la parte inmunológica de la artritis reumatoide, sino ayudando a detener el avance de la enfermedad de forma secundaria a la disfunción que surge como consecuencia de las articulaciones deformadas y la tensión sobre los cartílagos causada por la disfunción. La presente invención demostró ser eficaz para tratar o al menos aliviar los síntomas de la artrosis.

**Variaciones en la puesta en práctica de la invención**

35 Para los ejemplos anteriores, se siguieron estrictos estándares de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) para productos farmacéuticos. Ésta es una práctica opcional y no necesariamente dependiente de los requisitos del usuario.

40 Aunque anteriormente se ha enseñado un ejemplo de cómo se puede poner en práctica la presente invención, un experto en la materia también reconocerá que éstas son solamente para ilustración solamente y que son posibles muchas etapas equivalentes y alternativas en el método de preparación sin alejarse del alcance y espíritu de la invención.

45 Por ejemplo, aunque se use toda la hierba, las diversas partes de la hierba (tallo, hojas, flores, raíces, etc.) de la hierba pueden seleccionarse dentro del alcance de las reivindicaciones. Un experto en la materia observará que, es posible, con técnicas de cultivo de células y tejidos vegetales, cultivar las células y el tejido de estas hierbas *in vitro* y extraer los componentes activos de interés de estas células y tejidos. Por lo tanto, aunque la extracción de estos componentes activos a partir de partes de la planta secas es preferible y se enseña, la extracción de estos componentes a partir de células y tejido de la planta en cultivo también es posible.

50 En cuanto a la etapa de acidificación, pueden usarse muchos tipos de ácidos comestibles aparte del vinagre fermentado de forma natural. Por ejemplo, pueden usarse ácido acético sintetizado artificialmente o zumos de fruta naturales para acidificar la hierba. Además, aunque en la realización preferida se usó hueso de cerdo, cualquier hueso adecuado de otros animales tales como reptiles, mamíferos o peces puede usarse dentro del alcance de la presente invención. Adicionalmente, un experto en la materia reconocerá que, aunque la decocción se concentraba a presión reducida y el extracto se obtenía mediante secado por atomización, también es viable la obtención del

extracto mediante liofilización o secado por congelación.

Aunque el extracto de hierbas se envasaba en una cápsula, otros métodos adecuados de preparación para envasado también son viables. Para administración oral, los extractos pueden proporcionarse como un comprimido, suspensión acuosa u oleosa, polvo o gránulo dispersable, emulsión, cápsula dura o blanda, jarabe, elixir o bebida. Las composiciones previstas para uso oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticamente aceptables y dichas composiciones pueden contener uno o más de los siguientes agentes: edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y conservantes. Los edulcorantes y agentes aromatizantes aumentarán la palatabilidad de la preparación. Las cápsulas que contienen extractos mezclados con agentes o excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos adecuados para la fabricación de cápsulas son aceptables. Que los agentes son "farmacéuticamente aceptables" significa que los agentes deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la formulación (así como no perjudiciales para el paciente). Dichos excipientes incluyen diluyentes inertes tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, lactosa, fosfato cálcico o fosfato sódico; agentes de granulado y disgregantes, tales como almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes tales como almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden ser sin recubrimiento o pueden estar recubiertos mediante técnicas conocidas para retardar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y, de este modo, proporcionar una acción sostenida durante un periodo de tiempo más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de de glicerilo en solitario o con una cera.

Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse en forma de cápsulas de gelatina dura, en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín, o en forma de cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva. En algunas realizaciones, las suspensiones acuosas pueden contener un extracto de la invención mezclado con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen agentes de suspensión, agentes de dispersión o humectantes, uno o más conservantes, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas pueden formularse suspendiendo el ingrediente activo en un aceite vegetal, tal como aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. La suspensión oleosa puede contener un agente espesante, tal como cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Los agentes edulcorantes, tales como los que se han presentado anteriormente, y agentes aromatizantes pueden añadirse para proporcionar una preparación oral de sabor agradable. Estas composiciones pueden conservarse mediante un antioxidante añadido tal como ácido ascórbico. Polvos y gránulos dispersables de la invención adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan uno o más extractos mezclados con un agente de dispersión o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Excipientes adicionales, por ejemplo agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes, también pueden estar presentes.

Pueden formularse jarabes y elixires con agentes edulcorantes, tales como glicerol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un demulcente, un conservante, un aromatizante o un agente colorante.

Aunque se prefiere la administración oral, no se excluyen otros métodos de administración del extracto de la presente invención. Las preparaciones de extracto para administración parenteral pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica usando agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente aceptable por vía parenteral no tóxico, tal como una solución en 1,3-butanodiol. Los diluyentes adecuados incluyen, por ejemplo, agua, solución de Ringer y solución de cloruro sódico isotónica. Además, también pueden emplearse de forma convencional aceites fijados estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, cualquier aceite fijado insípido puede emplearse, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, pueden usarse ácidos grasos tales como ácido oleico, del mismo modo en la preparación de preparaciones inyectables.

Las composiciones farmacéuticas también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, tal como aceite de oliva o aceite de cacahuete, un aceite mineral tal como parafina líquida, o una mezcla de los mismos. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen gomas de origen natural tales como goma arábiga y goma tragacanto, fosfatidas de origen natural, tales como lecitina de soja, ésteres o ésteres parciales obtenidos de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tales como monooleato de sorbitán, y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, tales como polioxietileno monooleato de sorbitán. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

La cantidad de extracto que puede combinarse con el material vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del paciente tratado y del modo de administración particular.

Referencias

1. Cheng Y-X, Zhou J y Tan N-H (2001) *Journal of Integrative Plant Biology (Acta Botanica Sinica)* 43(7): 760-765  
New minor cyclic peptides from *Brachystemma calycinum*.
- 5 2. Cheng Y-X, Zhou J, Teng R-W y Tan N-H (2001) *Acta Botanica Yunnanica* 23(4): 527-530 Nitrogen-containing  
compounds from *Brachystemma calycinum*.
3. Cheng YX, Zhou J, Tan NH, Teng RW, Lu Y, Wang C y Zheng QT (2002) *Journal of Natural Products* 65(5):  
750-2 Isolation and characterization of Brachystemidines A-E, novel alkaloids from *Brachystemma calycinum*.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un extracto de *Brachystemma calycinum* en la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de artrosis.

5

2. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha composición está formulada para administración oral.

3. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha composición está formulada para administración parenteral.

10

4. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha composición comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

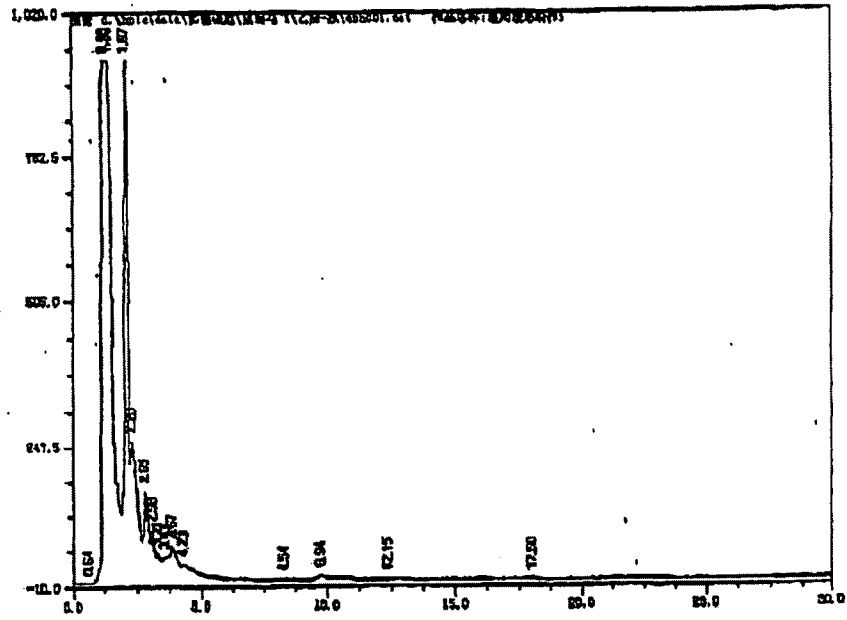
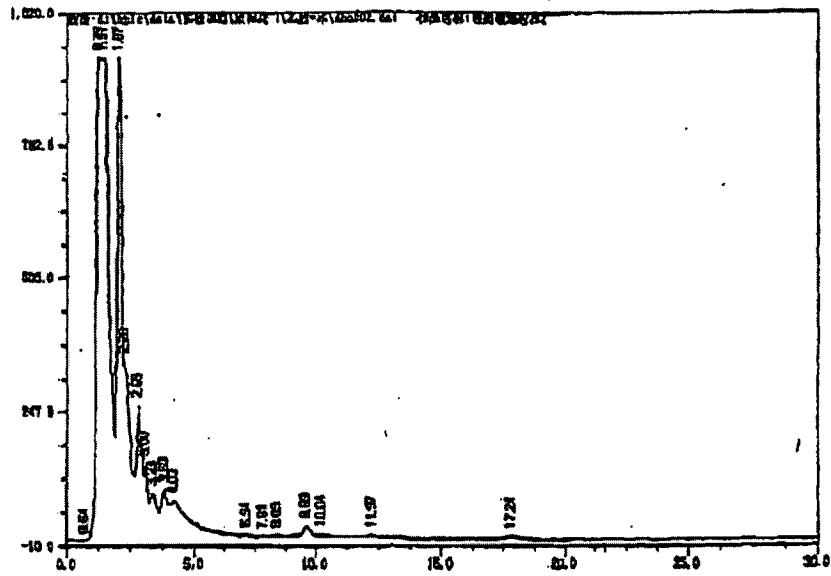


FIG. 1





**FIG. 2**

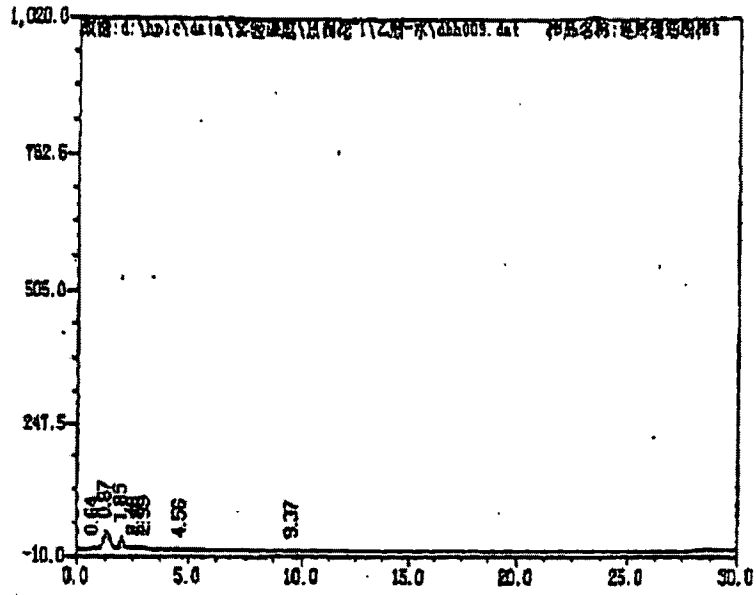


FIG. 3

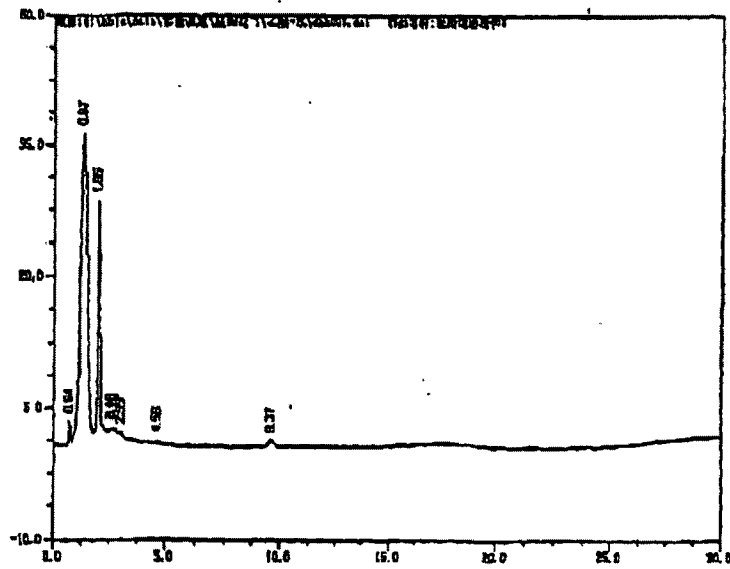


FIG. 4