

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 454 969**

51 Int. Cl.:

A61K 35/64 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

A61K 35/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2007 E 07764124 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 1927363**

54 Título: **Extracto para prevenir o tratar enfermedades trombóticas**

30 Prioridad:

28.06.2006 CN 200610086680

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

14.04.2014

73 Titular/es:

**MUDANJIANG YOUBO PHARMACEUTICAL CO.
LTD (100.0%)
No. 6, Wenhua Street, Aimin District, Mudanjiang
City
Heilongjiang 157011, CN**

72 Inventor/es:

LI, ZHENGUO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 454 969 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 para prevenir o tratar enfermedades trombóticas

Ámbito de la Invención

5 La presente invención se refiere a un extracto para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades trombóticas, y más particularmente a un extracto de sanguijuela y lombriz de tierra con un peso molecular menor que 5.800 Dalton, composiciones farmacéuticas que lo comprenden y procedimientos para la preparación y uso del mismo.

Descripción de las Técnicas Relacionadas

10 Como una especie de medicamento clásico para la eliminación de coágulos en la sangre, la Farmacopea China registra tres tipos de sanguijuela: *Whitmania pigra* Whitman, *Hirudo nipponica* Whitman y *Whitmania ac-ranulata* Whitman. Entre ellas, la *Whitmania pigra* Whitman es la más utilizada para preparar medicinas. Los principales elementos en la sanguijuela son proteínas, polipéptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, enzimas, azúcares, oligoelementos, etc. Muchas veces se ha informado sobre el estudio cualitativo y cuantitativo de los elementos de la sanguijuela como proteínas, aminoácidos, azúcares, oligoelementos, etc. Los métodos principales son TLC, HPLC, y
15 el método de electroforesis. Los principales elementos micromoleculares de la sanguijuela son hipoxantina, xantina, uracilo, uracilo ribósido, etc. Tanto la Pirimidina como la Purina son compuestos insaturados heterocíclicos que contienen átomos de Nitrógeno.

20 Como medicamento chino tradicional, en la Farmacopea China las lombrices de tierra tienen efectos en la eliminación del calor, como calmante, para pasar a través de las arterias y venas, suavizar el asma y la diuresis. Hay cuatro tipos de lombrices de tierra en la Farmacopea China. Son *Pheretima aspergillum* (E.Perrier), *Pheretima vulgaris* Chen, *Pheretima guillelmi* (Michaelson) y *Pheretima pectinifera* Michaelson. Entre ellos, la *Pheretima aspergillum* (E.Perrier), también conocida como *Lumbricus*, es la más utilizada para las medicinas. Los principales elementos en las lombrices de tierra son proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, enzimas, azúcares, etc. Se ha informado sobre el análisis cualitativo y cuantitativo de los elementos de la lombriz de tierra. Los principales
25 elementos micromoleculares de la lombriz son hipoxantina y compuestos que contienen átomos de Nitrógeno.

Los extractos de sanguijuela y lombriz de tierra son los componentes activos de la Inyección Shuxuetong, que posee un alto rendimiento y efecto inmediato en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. Las solicitudes de patentes chinas 03148281.3, 200410101538.8 y 200510000266.7 han descrito la Inyección Shuxuetong y el proceso de preparación de la misma, respectivamente. El contenido de estas solicitudes es
30 mencionado en la presente invención como referencia.

Los materiales que poseen inmunogenicidad usual son macromoléculas, y a mayor peso molecular mayor inmunogenicidad. Los polipéptidos micromoleculares usualmente tienen poca o ninguna inmunogenicidad. Los antígenos habitualmente son macromoléculas por las siguientes razones probables: (1) El peso molecular relativo de los antígenos es mayor, los genes superficiales químicos específicos (determinante antigénico) son más, por lo que
35 el efecto de estimulación de las células inmunológicas es mejor y se produce la respuesta inmunológica; (2) Los antígenos macromoleculares tienen composiciones químicas complejas y estructuras estables y no pueden ser fácilmente destruidos y eliminados, y pueden permanecer en el cuerpo del ser humano durante mucho tiempo. De esta manera pueden estimular el sistema inmunológico de manera persistente y generar la respuesta inmunológica. La insulina humana, compuesta de 51 aminoácidos (el peso molecular estándar de la insulina humana es 5.800 Dalton) es el límite de los materiales de alto peso molecular y de bajo peso molecular. Todos los materiales con un
40 peso molecular de más de 5800 Dalton se denominan materiales de alto peso molecular. Los materiales de alto peso molecular son estrictamente controlados en la inyección.

El documento US 5.246.715 describe una composición de la agregación de plaquetas sanguíneas que comprende una fracción aislada derivada de la saliva de las sanguijuelas Hirudinidae. El documento US 5.246.715, sin embargo,
45 no describe ningún extracto hecho a partir ni de sanguijuelas ni de lombrices de tierra.

El documento US 5.861.377 describe la purificación de hirustatin de la sanguijuela medicinal *Hirudo medicinalis* mediante la extracción de sanguijuelas homogeneizadas con acetona, seguido de etapas de purificación adicionales. El documento US 5.861.377, sin embargo, no describe ningún extracto hecho a partir ni de sanguijuelas ni de lombrices de tierra.

El documento WO 97/17981 describe un compuesto que tiene actividad antiviral, obtenible a partir de sanguijuelas por extracción con disolventes. El documento WO 97/17981, sin embargo, no describe ningún extracto hecho a partir ni de sanguijuelas ni de lombrices de tierra.

5 Seymour JL et al. (J. Biol. Chem. vol 265, nº 17, 1990, p.: 10143-10147) describen el descubrimiento, purificación y caracterización de decrosin, una proteína aislada de la especie de sanguijuela *Macrobdella decora*, que es un potente inhibidor de la agregación de plaquetas. Seymour JL et al., sin embargo, no describen ningún extracto hecho a partir ni de sanguijuelas ni de lombrices de tierra.

10 Yannes Oscar et al. (Mol. and Cell. Proteom., vol 4, nº 10, 2005, p.: 1602-1613) describen el cribado funcional de inhibidores de la proteasa serina en el extracto de la sanguijuela medicinal *Hirudo medicinalis*. Yannes Oscar et al., sin embargo, no describen ningún extracto hecho a partir ni de sanguijuelas ni de lombrices de tierra.

15 Los documentos CN 1 192 782 C, CN 1 651 079 A y CN 1 660 145 A, todos describen diferentes extractos hechos a partir tanto de sanguijuelas como de lombrices de tierra, útiles en la inhibición de la coagulación de la sangre, pero el peso molecular de los extractos descritos es sustancialmente superior a 5.800 Dalton, que es el peso molecular preferido de los extractos según la presente invención.

Sumario de la Presente Invención

20 El objeto principal de la presente invención es proporcionar un extracto para la prevención o el tratamiento de enfermedades trombóticas, y más particularmente un extracto de sanguijuela y lombriz de tierra con un peso molecular menor que 5.800 Dalton, y el proceso para la preparación y uso de los mismos. En comparación con la tecnología actual, el extracto es más seguro y confiable en clínica.

En consecuencia, a fin de cumplir el mencionado objetivo, a continuación se describe el programa tecnológico de la presente invención:

Un extracto para la prevención o el tratamiento de enfermedades trombóticas que se extrae de la materia prima de sanguijuela y lombriz de tierra se caracteriza por un peso molecular menor que 5.800 Dalton.

25 El extracto es un extracto de sanguijuela y lombriz de tierra. La mezcla de extracto de sanguijuela y lombriz de tierra es la mezcla de extracto de sanguijuela y extracto de lombriz de tierra, o el extracto de la mezcla de sanguijuela y lombriz de tierra.

30 La sanguijuela es la *Whitmania pigra* Whitman, *Hirudo nipponica* Whitman o *Whitmania ac-ranulata* Whitman. La lombriz de tierra es la *Pheretima aspergillum* (E.Perrier), *Pheretima vulgaris* Chen, *Pheretima guillelmi* (Michaelsen) o *Pheretima pectinifera* Michaelsen. De todas ellas, se prefieren la *Whitmania pigra* Whitman y la *Pheretima aspergillum* (E.Perrier) en seco o frescas.

35 El extracto se obtiene por filtración con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 6.000 Dalton (6.000 Dalton es lo preferido). Por ejemplo, el extracto (productos semiacabados o intermedios) que se obtiene por el método común de la técnica anterior a partir de la materia prima (sanguijuela y lombriz de tierra) es filtrado por la membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 6.000 Dalton (6.000 Dalton es lo preferido), luego se obtiene el extracto de sanguijuela y/o lombriz de tierra con un peso molecular menor que 5.800 Dalton.

Como preferencia, el extracto de la presente invención se obtiene por el proceso que contiene las siguientes etapas:

40 (1) La materia prima se limpia con agua para inyección o con disolución salina normal, se deja en remojo a baja temperatura y se filtra. Se obtiene un filtrado y residuos, respectivamente;

(2) Los residuos se aplastan y se mezclan con el filtrado que se obtiene en la etapa (1), y se obtiene un homogeneizado. El homogeneizado se congela y se derrite repetidamente, luego se centrifuga y se obtiene un sobrenadante;

(3) El sobrenadante que se obtiene en la etapa (2) se ultrafiltra con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que pueden interceptar materiales con peso molecular de entre 10.000 y 100.000 Dalton, y se obtiene un filtrado;

5 (4) El filtrado que se obtiene en la etapa (3) se ultrafiltra con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular mayor que 6.000 Dalton (6.000 Dalton es lo preferido).

Si es necesario, el proceso de filtración con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 6.000 Dalton (6.000 Dalton es lo preferido) se repite. El proceso de termocompresión es realizado antes de la filtración si es necesario, por ejemplo, el filtrado se termocomprime a 105-136°C durante 10 a 45 minutos.

10 Como preferencia, el extracto de la presente invención se obtiene por el proceso que contiene las siguientes etapas:

(1) La materia prima se limpia con agua para inyección o disolución salina normal y se aplasta, luego se obtiene un homogeneizado. El homogeneizado se congela y se derrite repetidamente, luego se centrifuga y se obtiene un sobrenadante;

15 (2) El sobrenadante que se obtiene en la etapa (1) se ultrafiltra con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con peso molecular de entre 10.000 y 100.000 Dalton, y se obtiene un filtrado;

(3) El filtrado que se obtiene en la etapa (2) se manipula con el método de cromatografía de intercambio iónico;

20 (4) El filtrado que se obtiene en la etapa (3) se ultrafiltra con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular mayor que 6.000 Dalton después/antes del proceso de desalinización.

Si es necesario, el proceso de filtración con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 6.000 Dalton (6.000 Dalton es lo preferido) se repite.

25 La membrana de ultrafiltración o la columna de ultrafiltración son los de uso común en este campo de la tecnología. Como la columna de ultrafiltración de fibra hueca en la cual el material es polisulfona y el peso molecular de corte es de no más de 6.000 Dalton (6.000 Dalton es lo preferido). Como la columna de ultrafiltración de fibra hueca en la cual el peso molecular de corte está entre 10.000 y 100.000 Dalton (10.000 o 50.000 Dalton es lo preferido).

30 La columna de intercambio iónico es una columna de intercambio de cationes o una columna de intercambio de aniones. La columna de intercambio catiónico es una de CM-sephadex, CM-agarosa, CM-celulosa, SP-sephadex, SP-agarosa, SP-celulosa, etc. La columna de intercambio aniónico es una de DEAE-sephadex, DEAE-agarosa, DEAE-celulosa, Q-sephadex, Q-agarosa, Q-celulosa, etc.

En el extracto de la presente invención se encuentran polipéptido, aminoácido e hipoxantina.

35 La materia prima de sanguijuela y lombriz de tierra es en seco o fresca. La materia prima de la sanguijuela y lombriz de tierra se extraen respectivamente, y se obtienen respectivamente el extracto de sanguijuela y el extracto de lombriz. O se extrae la mezcla de materia prima de sanguijuela y lombriz de tierra, y se obtiene una mezcla de extracto de sanguijuela y lombriz de tierra.

El extracto de la presente invención es líquido o sólido después de la deshidratación y secado.

40 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para la preparación del extracto. El proceso incluye la filtración con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar los materiales con un peso molecular de más de 6.000 Dalton (6.000 Dalton es lo preferido). Por ejemplo, la materia prima de sanguijuela y lombriz de tierra se extrae y separa con un método común de la tecnología actual, el extracto obtenido (que también se denomina producto semiacabado o intermedio) se filtra con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 6.000 Dalton (se prefiere 6,000 Dalton). Se obtiene un extracto de sanguijuela y/o lombriz de tierra con un peso molecular menor que 5.800 Dalton.

45 Se prefieren las siguientes etapas del proceso para la preparación del extracto de la presente invención, que incluyen:

(1) La materia prima se limpia con agua para inyección o disolución salina normal, se remoja a baja temperatura y se filtra. Se obtiene un filtrado y residuos, respectivamente;

5 (2) Los residuos se aplastan y mezclan con el filtrado que se obtiene en la etapa (1), y se obtiene un homogeneizado. El homogeneizado se congela y se derrite repetidamente, luego se centrifuga y se obtiene un sobrenadante;

(3) El sobrenadante que se obtiene en la etapa (2) se ultrafiltra con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que pueden interceptar materiales con peso molecular de entre 10.000 y 100.000 Dalton, y se obtiene un filtrado;

10 (4) El filtrado que se obtiene en la etapa (3) se ultrafiltra con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular mayor que 6.000 Dalton (6.000 Dalton es lo preferido).

Si es necesario, el proceso de filtración con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 6.000 Dalton (6.000 Dalton es lo preferido) se repite. El proceso de termocompresión se realiza antes de la filtración si es necesario, por ejemplo, el filtrado se termocomprime a 105-136°C durante 10 a 45 minutos.

15 La insulina humana cuyo peso molecular es 5800 Dalton es la referencia, y los materiales cuyo peso molecular es mayor al de la insulina humana son materiales de alto peso molecular.

Por ejemplo, el contrato de la presente invención se determina por HPLC de la siguiente manera:

A. Materiales e instrumentos

20 1. Material de peso molecular de proteínas estándar: insulina humana, el peso molecular es de 5.800 Dalton, 1 ml/rama, comprada al National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products.

2. Instrumentos

Espectrofotómetro ultravioleta-visible (Hitachi japonés U- 3210)

Cromatógrafo líquido de alto rendimiento Waters 600

Cromatógrafo líquido de alto rendimiento Agilent Hp 1100.

25 3. Reactivos

Ácido trifluoroacético, químicamente puro (Science and Technology University Chemical Industry and Material Institute)

Acetonitrilo, cromatográficamente puro (Dikma Company)

B. Condiciones cromatográficas

30 Columna cromatográfica: Columna de cromatografía de gel (TSK GEL 2000 SWx1 7,8 mm * 300 mm);

Fase móvil: ácido trifluoroacético-acetonitrilo-agua, su relación en volumen es 0,025:30:70;

Detector ultravioleta: longitud de onda de detección es 214±1 nm;

El caudal es 0,7 ml/min.

C. Determinación

35 Una muestra de cantidad adecuada de extracto e insulina humana se toman con precisión para mezclar con la fase móvil respectivamente, se obtienen una disolución de muestra y una disolución de control; la disolución de muestra y la disolución de control se toman con precisión para inyectar en el cromatógrafo líquido de alto rendimiento, respectivamente, determinado con el método de cromatografía líquida de alto rendimiento. Se registra un cromatograma. El contenido de materiales con un peso molecular mayor que el de la insulina humana se determina

calculando el contenido de los materiales correspondientes al pico cromatográfico para los cuales el tiempo de retención es más corto que el tiempo de retención del pico cromatográfico de la insulina humana. El contenido de alto peso molecular de la muestra es el contenido de materiales con un peso molecular de más de 5.800 Dalton en la muestra.

- 5 La distribución del peso molecular del extracto se determina con MS. Por ejemplo, la distribución de peso molecular del extracto se determinó con el siguiente método:

Una muestra de cantidad adecuada de extracto (o desalinizada si es necesario) se disuelve en disolución de TFA al 0,5%. La disolución de muestra y la matriz se mezclan entre sí con una relación de 1:1, identificada y secada a temperatura ambiente. El extracto es DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) o CCA (ácido a-ciano-4-hidroxicinámico).

- 10 El instrumento de determinación es Autoflex (Bruker Company). Condición MS (MALDI-TOF-MS); fuente de láser de N₂ cuya longitud de onda es 337nm; barrido lineal (longitud de tubo volante es 1,6 m, voltaje de aceleración 20 kv); el tipo de iones es de ion positivo o ion negativo.

El resultado de la determinación muestra que el peso molecular de todos los componentes del extracto de la presente invención es menor que 5.800 Dalton.

- 15 En otras palabras, después de haber sido determinado con el método anterior, no hay material con peso molecular mayor que 5.800 Dalton. Por tanto el peso molecular del extracto para la prevención o el tratamiento de enfermedades trombóticas no es mayor que 5.800 Dalton.

- 20 En el extracto hay polipéptido, aminoácidos e hipoxantina. Los polipéptidos y aminoácidos son analizados con el analizador de aminoácidos adecuado o cromatógrafo líquido de alto rendimiento. Por ejemplo, el método de HPLC en la edición 2005 de la Farmacopea China, sección primera, apéndice VI D, está referido a determinar el contenido de aminoácidos:

Prueba de las condiciones cromatográficas y adaptabilidad sistemática: el relleno es gel de sílice unido con octadecilsilano; la fase móvil es el líquido A o el líquido B, gradiente de elución, longitud de onda de detección de 338 nm y 262 nm, temperatura de la columna de 30-40°C.

- 25 Líquido A: una cantidad adecuada de acetato de sodio se disuelve en agua para inyección y luego se añade trietilamina. Se mezcla bien, el pH se ajusta a neutro y luego se añade THF.

Líquido B: una cantidad adecuada de acetato de sodio se disuelve en agua para inyección, y luego el pH se ajusta a neutro con ácido acético. Se agrega la cantidad adecuada de una mezcla de acetonitrilo y metanol (1:1), se mezcla bien.

- 30 Se añade la cantidad adecuada de disolución tampón de ácido bórico de pH 10,4 en la cantidad adecuada de control de aminoácido, y se añade o-ftalaldehído y un reactivo derivado del 9-fluorenometil formiato de cloro. La mezcla se agita de manera uniforme con el fin de que reaccione suficientemente y se obtiene el aminoácido ácido o-ftálico 9-fluorenometil formiato de cloro que es la disolución de control. Como muestra, el extracto de la presente invención se manipula con el mismo método, y el aminoácido del extracto se determina con cromatografía líquida de alto rendimiento.

El método de HPLC en la Farmacopea China edición 2005 1ª sección, apéndice VI D se refiere a determinar el contenido de hipoxantina. La fase fija es gel de sílice unido con octadecilsilano, la fase móvil es una disolución de fosfato de sodio dibásico al 0,1%, y la longitud de onda de detección es de 254 nm. El número teórico de placa no es menor que 3000 de acuerdo a la hipoxantina.

- 40 En la prueba de estímulo local del conejo, 1 ml de disolución del extracto de la cual la concentración es de 0,5 g/ml se inyecta en los músculos cuádriceps de las piernas izquierda y derecha del conejo. El conejo es sacrificado 48 horas más tarde. Los cuádriceps de ambas piernas del conejo se retiran y se practica una incisión longitudinal. Después de observar la reacción estimulativa local, los cuádriceps se ponen en una disolución de formaldehído al 10% y se revisan con el método común de la histopatología. Resultado: a simple vista no hay congestión ni necrosis
- 45 en los músculos cuádriceps de las piernas del conejo. El valor es 0 de acuerdo con el grado de reacción en la reacción estimulativa, en otras palabras, no hay cambio evidente. Esto confirma que no hay reacción inflamatoria

evidente a través de la inspección patológica. También muestra que el extracto no puede causar una reacción estimulativa local evidente.

5 En la prueba estimulativa de los vasos sanguíneos del conejo, 1 g/kg (25 veces la cantidad en clínica) de la disolución del extracto cuya concentración es de 0,5 g/ml se inyecta en la vena de la oreja de conejo 1 vez al día durante 3 días. Las partes de la oreja para la posición de la inyección son fijas y se revisan con el método común de la histopatología. Para observar si hay reacción inflamatoria en la vena inyectada. Resultado: se muestra que no hay tejido necrótico y desnaturalizado y la inyección repetida del extracto en la vena no puede causar una reacción inflamatoria evidente a las venas locales.

10 En la prueba alérgica de cobaya cavia, 6 cobayas cavia saludables se separan en 2 grupos en promedio. 0,5 ml de la disolución de extracto cuya la concentración es de 0,5 g/ml se inyecta en la cavidad abdominal de todas las cobayas cavia, respectivamente, en el 1º, 3º y 5º días. Las cobayas cavia del primer grupo se inyectan con 1 ml de la disolución de extracto en el día 15º. Las cobayas cavia del segundo grupo se inyectan con 1 ml de la disolución de extracto en el día 22º. Para observar si hay fenómenos de piloerección (pelo vertical), disnea, estornudos, vómito seco, tos, sonido de gong, espasmos, atrofia, muerte, etc., 15 minutos después de la inyección. Resultado: después de que todas las inyecciones se han completado, nunca aparecen todos los fenómenos. Esto demuestra que el extracto no puede ocasionar una respuesta alérgica en la cobaya cavia.

15 En la prueba hemolítica del conejo, no hay hemólisis o eritro-aglutinación. Esto demuestra que el extracto no puede causar hemólisis.

20 Por tanto el extracto se puede utilizar como materia prima para realizar muchos tipos de preparación. La presente invención también está relacionada con un tipo de combinación farmacéutica que contiene el extracto como componente activo. La combinación farmacéutica es tabletas, cápsulas, medicamento granulado, agente filmico, parches, recubrimiento, supositorio, perlas, polvo, ungüento, mezcla (líquido por la boca), jarabes, tintura, preparado ocular, preparado nasal, inyección, polvo aséptico para inyección, disolución concentrada para inyección o preparados de liberación prolongada o de liberación controlada. Todo preparado es una preparación farmacéutica de rutina, por lo que las preparaciones anteriores se pueden obtener con la tecnología farmacéutica de rutina en este campo.

25 El extracto o combinación farmacéutica que puede prevenir o tratar enfermedades trombóticas puede ser utilizado para preparar medicamentos para la prevención o el tratamiento de enfermedades trombóticas. Por ejemplo, el medicamento puede prevenir y tratar la hiperlipemia, arteriosclerosis, infarto de miocardio, angina, infarto ateroesclerótico de cerebro, embolia cerebral, trombosis de vena, embolia pulmonar, infarto pulmonar, tromboangeitis obliterante, oclusión de la arteriosclerosis, coagulación intravascular diseminada (CID), cirugía complicada por la trombogénesis y tromboembolismo, infarto de hígado, infarto de riñón, infarto de colecisto, infarto de mesenterio, gangrena de extremidades, neuropatía diabética periférica, embolia arterial de retina o sordera súbita, etc.

30 La ventaja importante del extracto que puede prevenir o tratar enfermedades trombóticas es: el peso molecular de sus todos los componentes es de menos de 5.800 Dalton, por lo que nunca o casi nunca da pie a una reacción inmune. Debido a que su peso molecular relativo es bajo. Comparando con otros extractos existentes de sanguijuela y/o lombriz de tierra, el número de las micropartículas insolubles en el extracto de la presente invención es menor y su diámetro más pequeño, por lo que la seguridad del extracto de la presente invención ha mejorado evidentemente. Comparando con otros extractos existentes de sanguijuela y/o lombriz de tierra, la actividad o el efecto terapéutico del extracto de la presente invención es equivalente o mejor. El extracto de la presente invención se puede utilizar sin prueba dérmica, esto puede acortar el tiempo para salvar pacientes y aliviar el sufrimiento de los mismos.

35 Estos y otros objetivos, características y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos que se acompañan, y las reivindicaciones adjuntas.

Breve Descripción de los Dibujos

45 La figura 1 es el gráfico de detección del cromatograma líquido de alto rendimiento de la insulina humana (5.800 Dalton).

La figura 2 es el gráfico de detección del cromatograma líquido de alto rendimiento del extracto de sanguijuela y/o lombriz de tierra de la presente invención.

La figura 3 es un gráfico de detección de espectrometría de masa del extracto de sanguijuela de la presente invención, en el que el material de base es CCA, y la detección es del ion positivo.

La figura 4 es un gráfico de detección de espectrometría de masa del extracto de lombriz de tierra en la presente invención, el material de base es de DHB, y la detección es del ion negativo.

5

Descripción Detallada de la Preparación Preferida

Realización 1:

10 Una cantidad equivalente de sanguijuela y lombriz de tierra secas se ponen a remojo en disolución salina normal o agua para inyección de modo que su superficie pueda ser propagada adecuadamente, luego se lava repetidamente con disolución salina normal o agua para inyección y se pone en 2-4 veces su volumen de disolución salina normal o agua para inyección, a 0-4 grados para dejarlo a remojo durante 24 horas y luego se filtra, después el filtrado y los residuos sólidos se conservan para su uso.

15 Los residuos sólidos se machacan en pedazos con el triturador de tejidos por gravedad. El filtrado se mezcla con los residuos sólidos molidos, y luego la mezcla se muele hasta conseguir un homogeneizado cuyo diámetro es menor que 0,5 micrómetros. El homogeneizado se congela a -15°C durante 15-30 horas y se derrite a 0-4°C. Luego, el proceso anterior se repite al menos 2 veces.

20 El líquido descongelado se centrifuga con la máquina centrifuga y se obtiene un sobrenadante. A continuación, el sobrenadante se filtra con una columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 50.000 Dalton. El filtrado obtenido se filtra nuevamente con una columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 10.000 Dalton.

El filtrado así obtenido finalmente se filtra con una columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 6.000 Dalton. El filtrado se termocomprime a 105-136°C durante 10 a 45 minutos y se filtra nuevamente con una columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 6.000 Dalton. Así se obtiene el extracto líquido.

25 Si es necesario, se elimina el agua del extracto líquido y se seca hasta obtener un sólido.

Gracias al método anterior se determina que el extracto contiene polipéptidos, aminoácidos e hipoxantina. No hay materiales con peso molecular de más de 5.800 Dalton en el extracto, por lo que el peso molecular de todos los materiales obtenidos en el extracto es menor que 5800 Dalton. El resultado de la detección cromatográfica se muestra en las figuras 1 y 2.

30 Todos los datos de los picos de la figura 1 y 2 se muestran en la tabla 1 y 2.

Tabla 1 resultado de la detección de la insulina humana en la figura 1

Cantidad de picos	Tiempo de retención (min)	Tipo	Anchura (min)	Área (mUA)	Porcentaje del área (%)
1	12.027	BB	0.2851	3618.27271	100
Superficie total: 3618.27271					

Tabla 2 resultado de la detección de extracto en la presente invención en la figura 2

Cantidad de picos	Tiempo de retención (min)	Tipo	Anchura (min)	Área (mUA)	Porcentaje del área (%)
1	12.027		0.0000	0.00000	0.0000
2	13.592	BV	0.8089	2312.62329	10.6292

ES 2 454 969 T3

Cantidad de picos	Tiempo de retención (min)	Tipo	Anchura (min)	Área (mUA)	Porcentaje del área (%)
3	14.847	VV	0.6827	4560.51563	20.9610
4	15.491	VV	0.2442	4643.37012	21.3418
5	16.095	VV	0.2940	2566.93359	11.7981
6	16.391	VV	0.3904	4863.65332	22.3542
7	18.802	VV	0.6900	1752.47546	8.0547
8	19.298	VP	0.5804	1057.62390	4.8610
Superficie total: 2.17572e4					

Realización 2:

5 Una cantidad equivalente de sanguijuela y lombriz de tierra secas o frescas se dejan a remojo en disolución salina normal o agua para inyección de modo que su superficie pueda ser propagada adecuadamente, luego se lava repetidamente con disolución salina normal o agua para inyección y se pone en 2-4 veces su volumen de disolución salina normal o agua para inyección, a 0-4 grados para dejarlo a remojo durante 24 horas y filtrarlo, luego el filtrado y los residuos sólidos se conservan para su uso.

10 Los residuos sólidos se machacan en pedazos con el triturador de tejidos por gravedad. El filtrado se mezcla con los residuos sólidos molidos, y luego la mezcla se muele hasta conseguir un homogeneizado cuyo diámetro es menor que 0,5 micrómetros. El homogeneizado se congela a -15°C durante 15-30 horas y se derrite a 0-4°C. Luego, el proceso anterior se repite al menos 2 veces.

15 El líquido descongelado se centrifuga con la máquina centrifuga y se obtiene un sobrenadante. A continuación, el sobrenadante se filtra con una columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 50,000 Dalton. El filtrado obtenido se filtra nuevamente con una columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 10,000 Dalton, y se obtiene el filtrado.

20 El filtrado se ajusta a un pH de 6,0-7,0 con un tampón de fosfato, a continuación, pasa a la columna de intercambio catiónico de glucano reticulado con CM y se eluye con un tampón de 5 veces el volumen al mismo tiempo. El eluyente se recoge y se ajusta a pH 6.0-7.0 de nuevo, a continuación pasa a la columna de intercambio aniónico de glucano reticulado con DEAE y se eluye con un tampón. El eluyente se abandona, y después se eluye con una mezcla de tampón de pH 6,0-7,0 y 0,2-0,5 moles/l de cloruro de sodio. El eluyente se recoge y se filtra con una columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 6.000 Dalton y se desaliniza, a continuación, se obtiene el extracto líquido. Se obtienen respectivamente el extracto líquido de la sanguijuela y el extracto líquido de lombriz, luego se mezclan y se obtiene el extracto de sanguijuela y lombriz de tierra.

25 Si es necesario, se elimina el agua del extracto líquido y se seca hasta obtener un sólido.

Gracias al método anterior se determina que el extracto contiene polipéptidos, aminoácidos e hipoxantina. No hay materiales con peso molecular de más de 5.800 Dalton en el extracto, por lo que el peso molecular de todos los materiales obtenidos en el extracto es menor que 5800 Dalton.

Realización 3:

30 Una cantidad equivalente de sanguijuela y lombriz de tierra secas o frescas se dejan a remojo en disolución salina normal o agua para inyección respectivamente de modo que su superficie pueda ser propagada adecuadamente, luego se lava repetidamente con disolución salina normal o agua para inyección y se pone en 2-4 veces su volumen de disolución salina normal o agua para inyección, a 0-4 grados para dejarlo a remojo durante 24 horas y se filtra, y después el filtrado y los residuos sólidos se conservan para su uso.

Los residuos sólidos se machacan en pedazos con el triturador de tejidos por gravedad. El filtrado se mezcla con los residuos sólidos molidos, y luego la mezcla se muele hasta conseguir un homogeneizado cuyo diámetro es menor que 0,5 micrómetros. El homogeneizado se congela a -15°C durante 15-30 horas y se derrite a 0-4°C. Luego, el proceso anterior se repite al menos 2 veces.

5 El líquido descongelado se centrifuga con la máquina centrifuga y se obtiene un sobrenadante. A continuación, el sobrenadante se filtra con una columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 50.000 Dalton. El filtrado obtenido se filtra nuevamente con una columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 10.000 Dalton.

10 El filtrado así obtenido finalmente se filtra con una columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 6.000 Dalton. El filtrado se termocomprime a 105-136°C durante 10 a 45 minutos y se filtra nuevamente con una columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 6.000 Dalton. Luego se obtiene el extracto líquido. Y se obtienen respectivamente el extracto de sanguijuela y el extracto de lombriz.

15 El peso molecular de los materiales del extracto de sanguijuela y el extracto de lombriz de tierra es inferior a 5800 Dalton a través de la determinación del método de la MS anteriormente citado. El resultado se muestra en las figuras 3 y 4.

20 El extracto de sanguijuela y lombriz de tierra se obtiene luego de que se mezclan el extracto de sanguijuela y el extracto de lombriz de tierra. Al extracto mixto se añade el 4% de manitol y 0,5-1% de carbono activo para eliminar pirógenos, después se filtra con una película micro-porosa, es envasado en ampollas, se liofiliza, se sella y determina, así se obtiene el polvo inyectable del extracto liofilizado.

Realización 4:

25 La sanguijuela en seco o fresca se dejan a remojo en disolución salina normal o agua para inyección de modo que su superficie pueda ser propagada adecuadamente, luego se lava repetidamente con disolución salina normal o agua para inyección y se pone en 2-4 veces su volumen de disolución salina normal o agua para inyección, a 0-4 grados para dejarlo a remojo durante 24 horas y se filtra, luego el filtrado y los residuos sólidos se conservan para su uso.

30 Los residuos sólidos se machacan en pedazos con el triturador de tejidos por gravedad. El filtrado se mezcla con los residuos sólidos molidos, y luego la mezcla se muele hasta conseguir un homogeneizado cuyo diámetro es menor que 0,5 micrómetros. El homogeneizado se congela a -15°C durante 15-30 horas y se derrite a 0-4°C. Luego, el proceso anterior se repite al menos 2 veces.

El líquido descongelado se centrifuga con la máquina centrifuga y se obtiene un sobrenadante. A continuación, el sobrenadante se filtra con una columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 50.000 Dalton. El filtrado obtenido se filtra nuevamente con una columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 10.000 Dalton.

35 El filtrado finalmente obtenido se termocomprime a 105-136°C durante 10 a 45 minutos y se filtra con una columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 6.000 Dalton 2-3 veces. Así se obtiene el extracto líquido.

Al extracto líquido se añade 5,4% de β -ciclodextrina, se agita uniformemente, se deja en remojo a 45°C durante 30 minutos con el fin de envolverlo por completo y se seca por pulverización. Así se obtiene el polvo seco.

40 Al polvo seco se añade 1,5% de dióxido de silicio, 0,3% de PVP y 1% de hidroximetilalmidón. La mezcla se mezcla de manera uniforme, se granula y se envasa en cápsulas duras. Y cada cápsula contiene 1 g del polvo seco.

Realización 5:

El extracto se obtiene con el método de la realización 1.

45 Al extracto se añade 6,4% de almidón, se mezcla de manera uniforme, se seca y se tamiza. Contiene polvo para uso medicinal.

Al polvo se añade 0,1% de polvo de sílice y 0,1% de estearato de magnesio, se mezcla de manera uniforme y se envasa en cápsulas duras.

Realización 6: influencia en el tiempo de coagulación para ratones

- 5 Ratones machos de la especie Kunming, de 20 ±2g, son separados en 3 grupos al azar, 16 ratones por grupo. Los tres grupos de ratones se inyectan con 10 ml/kg de disolución salina normal, 2,5 g/kg de extracto de ZL03148281.3 y 2,5 g/kg del extracto de la presente invención (preparación 1) , respectivamente, en la vena de la cola de los ratones. Se toman muestras de sangre en la cuenca de los ojos de los ratones 15 minutos más tarde y se mide el tiempo de coagulación con el método de los vasos capilares. El resultado se muestra en la tabla 3.
- 10 Tabla 3 influencia en el tiempo de coagulación en ratones ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	n	Dosis (g/kg)	Tiempo de coagulación (s)	Incremento del tiempo de coagulación
Disolución salina normal	16	10.0	70.9±17.9	-
Extracto de ZL03148281.3	16	2.5	110.5± 31.9*	55.8
Extracto de la presente invención	16	2.5	113.7±27.9*#	60.4

PD: *P<0.01 en comparación con el grupo de disolución salina normal; # P>0.05 comparando con extracto de ZL03148281.3

- 15 El resultado se muestra en la Tabla 3: el extracto de ZL03148281.3 puede prolongar marcadamente el tiempo de coagulación en los ratones (Q=5.9637 en comparación con el grupo de disolución salina normal, P<0.01), el extracto de la presente invención también puede prolongar marcadamente el tiempo de coagulación de los ratones (Q=6.4456 en comparación con el grupo de disolución salina normal, P<0.01). Estos dos extractos pueden prolongar marcadamente el tiempo de coagulación de los ratones, pero no se distingue diferencia entre ellos (Q=0.4819, P>0.05).

Realización 7: influencia en las plaquetas y la tasa de adherencia de plaquetas en el ratón

- 20 1. influencia en las plaquetas

Ratones machos de 220 a 270 gramos son separados en 3 grupos, 10 ratones por grupo. Los tres grupos de ratones se inyectan con 5 ml/kg de disolución salina normal, 1.0 g/kg del extracto de la presente invención y 1.0 g/kg de extracto de ZL03148281.3, respectivamente, en la vena de la cola de los ratones. Se toman muestras de sangre en las cuencas de los ojos de los ratones 15 minutos más tarde y se miden las plaquetas con un globulímetro. El resultado se muestra en la tabla 4.

2. influencia para evaluar la tasa de adherencia de plaquetas

- 30 Ratones machos de 220 a 270 gramos son separados en 3 grupos, 10 ratones por grupo. Los tres grupos de ratones se inyectan con 5 ml/kg de disolución salina normal, 1.0 g/kg del extracto de la presente invención y 1.0 g/kg de extracto de ZL03148281.3, respectivamente, en la vena de la cola de los ratones. Se toman muestras de sangre en cuencas de los ojos de los ratones 15 minutos más tarde y se mide el número de plaquetas. Este es el número de plaquetas antes de la adherencia. 1.5 ml de sangre se coloca en el tubo en el que hay 0.3 ml de disolución de citrato de sodio al 3.8%. Se mezcla uniformemente y se toma 1 ml de la mezcla en un anillo de tubo de silicona. El anillo se pone en la máquina de reacción de adhesión de plaquetas - vitro trombogénesis, y se la hace funcionar durante 5 minutos a una velocidad de 17 rpm. Se toman muestras de sangre para medir la cantidad de plaquetas como el número de plaquetas después de la adherencia y se calcula la tasa de adherencia de las plaquetas. El resultado se muestra en la tabla 4. El método de cálculo de plaquetas es el siguiente:

tasa de adherencia (%) = número de plaquetas antes de la adherencia - número de plaquetas después de la adherencia / número de plaquetas antes de la adherencia x 100%

Tabla 4 influencia en las plaquetas y la tasa de adherencia de plaquetas en ratas

grupo	n	Dosis (g/kg)	Número de plaquetas (10 ³ /mm ³)	Reducción de plaquetas (%)	tasa de adherencia de plaquetas (%)
Disolución salina normal	10	5.0	171.1±45.6	-	-
Extracto de ZL03148281.3	10	1.0	148.5±22.1*	12.2	37.5±13.5
Extracto del presente invento	10	1.0	131.4±17.2**#	15.2	32.0±12.9 #

5 Ps: *P<0.05, **P<0.01 en comparación con el grupo de disolución salina normal; #P>0.05 en comparación con el extracto de ZL03148281.3

10 El resultado se muestra en la tabla 4: el extracto de ZL03148281.3 puede disminuir marcadamente el número de plaquetas de los ratones normales (Q=2.9260, P<0.05 en comparación con el grupo de disolución salina normal, P<0.01), el extracto de la presente invención también puede disminuir marcadamente el número de plaquetas de ratones normales (Q = 5.1399, P < 0,01 comparado con el grupo de disolución salina normal, P < 0.01). Estos dos extractos pueden disminuir el número de plaquetas de los ratones normales, pero no se distingue diferencia entre ellos (Q=2.2139, P>0.05). Se muestra que el extracto de la presente invención y el extracto de ZL03148281.3 pueden ambos disminuir el número de plaquetas y la tasa de adherencia de las plaquetas y disminuir la formación de trombos.

15 Realización 8: detección de cuerpos extraños visibles y de micropartículas insolubles

El extracto de sanguijuela y lombriz de tierra (denominado más abajo extracto de ZL03148281.3) se obtiene a partir de una cantidad equivalente de sanguijuela en seco y lombriz de tierra en seco de acuerdo con el método en ZL03148281.3.

20 1. detección de materias extrañas visibles: las materias extrañas visibles en el extracto de la presente invención (realización 1) y en el extracto de ZL03148281.3 se detectan, respectivamente, de acuerdo con la norma general de preparación de inyecciones de la Farmacopea China (edición de 2005). El resultado se muestra en la tabla 5.

Tabla 5 resultado de la detección de materias extrañas visibles

Muestra	Tasa calificada de detección de la lámpara	Fibra corta y pequeña
extracto de la presente invención	92.7%	3.9%
extracto de ZL03148281.3	63.7%	28.5%

25 El resultado muestra que, en materias extrañas visibles, hay una notable diferencia entre el extracto de la presente invención y el extracto de ZL03148281.3. La tasa calificada de detección de la lámpara y la fibra corta y pequeña de extracto de la presente invención son notablemente mejores que los del extracto de ZL03148281.3. Por lo tanto el extracto de la presente invención es más seguro.

2 Detección de micropartículas insolubles: las micropartículas insolubles en el extracto de la presente invención (preparación 1) y el extracto de ZL03148281.3 se detectan, respectivamente, de acuerdo con la norma general de preparación de inyecciones de la Farmacopea China (edición de 2005). El resultado se muestra en la tabla 6.

Tabla 6 resultado de la detección de micropartículas insolubles

Muestra	Micropartículas de más de 10um (valor medio/rama)	Micropartículas de más de 25um (valor medio/rama)
extracto de la actual invención	196/rama	65/rama
extracto de ZL03148281.3	250/rama	110/rama

5 El resultado muestra que hay una notable diferencia entre el extracto de la presente invención y el extracto de ZL03148281.3 en micropartículas insolubles. El número de micropartículas insolubles del extracto de la presente invención es notablemente menor que el del extracto de ZL03148281.3. Por lo tanto el extracto de la presente invención es más seguro.

10 Los resultados anteriores muestran que: no hay diferencia evidente en la acción farmacéutica entre el extracto de la presente invención y el extracto de ZL03148281.3, y el primero es mejor que el último en algunos índices. En otras palabras, el extracto de presente invención es mucho más seguro y no tiene menor actividad que el extracto de ZL03148281.3.

15 Un experto en la materia entenderá que la realización de la presente invención como se muestra en los dibujos y se ha descrito anteriormente se presenta a modo de ejemplo solamente y no pretende ser limitante.

Por tanto, se observará que el objetivo de la presente invención se ha cumplido plena y eficazmente. Sus preparaciones se han mostrado y descrito con el propósito de ilustrar los principios funcionales y estructurales de la presente invención y está sujeta a cambios sin apartarse de tales principios. Por lo tanto, esta invención incluye todas las modificaciones comprendidas dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

20

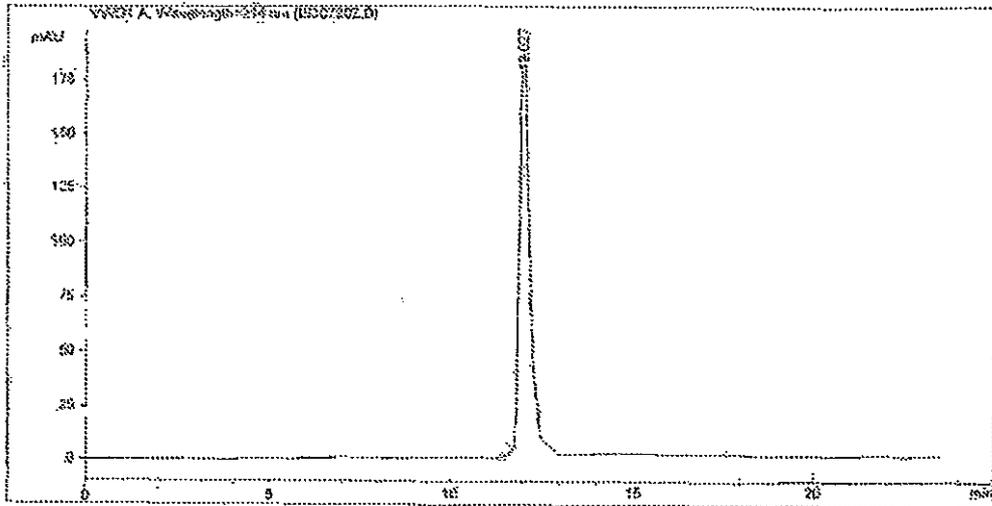
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un extracto de sanguijuela y lombriz de tierra para usar en la prevención o tratamiento de enfermedades trombóticas, que se extrae de la sanguijuela *Whitmania pigra* Whitman, *Hirudo nipponica* Whitman o *Whitmania acranulata* Whitman y lombriz *Pheretima aspergillum*, *Pheretima vulgaris* Chen, *Pheretima guillelmi* o *Pheretima pectinifera*, y que se caracteriza por un peso molecular de menos de 5.800 Dalton.
2. Un extracto de sanguijuela y lombriz de tierra para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho extracto se obtiene mediante el uso de una membrana de ultrafiltración o una columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales con un peso molecular de más de 6.000 Dalton.
- 10 3. Un extracto de sanguijuela y lombriz de tierra para usar según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho extracto se hace mediante las siguientes etapas:
- (1) limpiar la sanguijuela y la lombriz de tierra con agua para inyección o disolución salina normal, dejar en remojo a baja temperatura, filtrar y obtener el filtrado y los residuos sólidos;
- (2) aplastar dichos residuos y luego mezclarlos con dicho filtrado formando un homogeneizado, congelar y derretir dicho homogeneizado varias veces, centrifugar a continuación y obtener el sobrenadante;
- 15 (3) ultrafiltrar el sobrenadante obtenido en la etapa (2) con una membrana de ultrafiltración o una columna de ultrafiltración que intercepta los materiales de peso molecular entre 10.000-100.000 Dalton, y obtener el filtrado; y
- (4) ultrafiltrar dicho filtrado obtenido en la etapa (3) con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales de peso molecular de más de 6.000 Dalton y obtener el
- 20 filtrado; y
- opcionalmente, dicho filtrado se ultrafiltra repetidamente con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales de peso molecular de más de 6.000 Dalton, y,
- opcionalmente, el filtrado se termocomprime antes de ser filtrado, por ejemplo, dicho filtrado se termocomprime a 105-136°C durante 10 a 45 minutos.
- 25 4. Un extracto de sanguijuela y lombriz de tierra para usar de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho extracto se obtiene mediante las siguientes etapas:
- (1) limpiar la sanguijuela y la lombriz de tierra con agua para inyección o disolución salina normal, aplastar para formar un homogeneizado, congelar y derretir dicho material homogeneizado en repetidas ocasiones, a continuación, centrifugar y obtener el sobrenadante;
- 30 (2) ultrafiltrar dicho sobrenadante obtenido en la etapa (1) con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales de peso molecular de entre 10.000-100.000, Dalton, y obtener el filtrado;
- (3) procesar dicho filtrado obtenido en la etapa (2) con cromatografía de intercambio iónico; y
- (4) desalinizar dicho filtrado obtenido en la etapa (3), a continuación ultrafiltrar con membrana de
- 35 ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales de peso molecular de más de 6.000 Dalton, o ultrafiltrar dicho filtrado obtenido en la etapa (3) con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales de peso molecular de más de 6.000 Dalton y, a continuación, desalinizar y
- opcionalmente, dicho filtrado se ultrafiltra repetidamente con membrana de ultrafiltración o columna
- 40 de ultrafiltración que puede interceptar materiales de peso molecular de más de 6.000 Dalton.
5. El extracto de sanguijuela y lombriz de tierra para usar según la reivindicación 3 ó 4, en el que dicho extracto contiene polipéptidos, aminoácidos e hipoxantina, y en el que dichas sanguijuelas y lombrices de tierra que han de ser limpiados en la etapa (1) son en seco y/o frescas, y dichas sanguijuelas y lombrices de tierra se extraen juntos o

por separado, y en el que dicho extracto se obtiene en forma líquida, o se convierte en sólido por deshidratación y secado.

6. Un método para obtener el extracto según se detalla en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las siguientes etapas:

- 5 (1) limpiar la sanguijuela y la lombriz de tierra con agua para inyección o disolución salina normal, dejar en remojo a baja temperatura, filtrar y obtener el filtrado y residuos sólidos;
- (2) aplastar dichos residuos, y luego mezclar con el mencionado filtrado obtenido en la etapa (1) formando un homogeneizado, congelar y derretir dicho homogeneizado varias veces, luego centrifugar y obtener el sobrenadante;
- 10 (3) ultrafiltrar dicho sobrenadante obtenido en la etapa (2) con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales de peso molecular de entre 10.000-100.000 Dalton, y obtener el filtrado y
- (4) ultrafiltrar con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales de peso molecular de más de 6.000 Dalton y obtener el filtrado; y
- 15 opcionalmente, dicho filtrado se ultrafiltra repetidamente con membrana de ultrafiltración o columna de ultrafiltración que puede interceptar materiales de peso molecular de más de 6.000 Dalton; y
- opcionalmente, el filtrado se termocomprime antes de ser filtrado, por ejemplo, dicho filtrado se termocomprime a 105-136°C durante 10 a 45 minutos.
7. El extracto de sanguijuela y lombriz de tierra para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho extracto es un componente activo de una combinación farmacéutica.
- 20 8. El extracto de sanguijuela y lombriz de tierra para usar de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha combinación farmacéutica es en forma de tabletas, cápsulas, medicamento granulado, agente filmico, parches, recubrimiento, supositorio, perlas, polvo, ungüento, mezcla (líquido para administración oral), jarabes, tintura, preparado ocular, preparado nasal, inyección, polvo aséptico para inyección, disolución concentrada para inyección o preparados de liberación prolongada o de liberación controlada.
- 25 9. El extracto de sanguijuela y lombriz de tierra para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o las reivindicaciones 8 a 9, en el que dicho uso se hace para la prevención o el tratamiento de enfermedades trombóticas tales como la hiperlipemia, arteriosclerosis, infarto de miocardio, angina, infarto aterosclerótico de cerebro, embolia cerebral, trombosis de vena, embolia pulmonar, infarto pulmonar, tromboangeitis obliterante, oclusión por arteriosclerosis, coagulación intravascular diseminada (CID), cirugía complicada por la trombogénesis y
- 30 tromboembolismo, infarto de hígado, infarto de riñón, infarto de colecisto, infarto de mesenterio, gangrena de extremidades, neuropatía diabética periférica, embolia arterial de retina o sordera súbita.



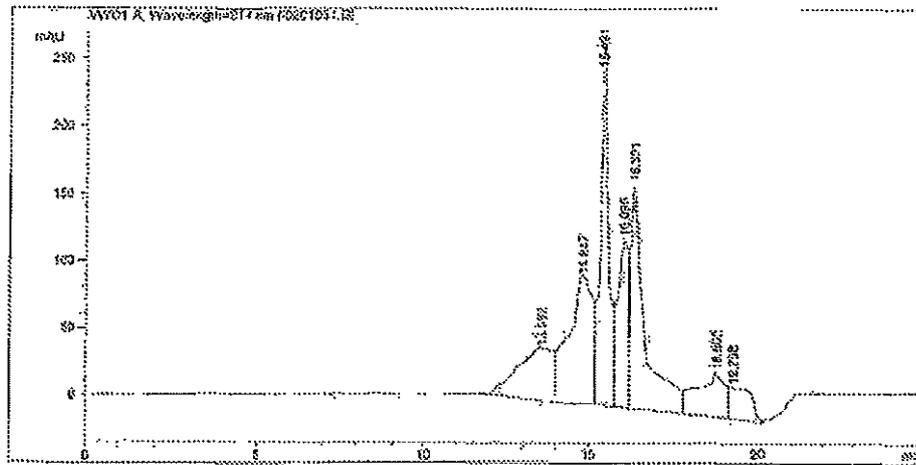
Informe de Porcentajes de Áreas

Pico #	Tiempo de Retención [min.]	Tipo	Anchura [min.]	Área [mAv]	Área %	Nombre
1	12.027	BB	0.2851	3618.27271	100.0000	Insulina
Total :				3618.27271		

Resultados obtenidos con un integrador mejorado:

*** Fin del informe ***

Fig. 1



Informe de Porcentajes de Áreas

Pico %	Tiempo de Retención [min]	Tipo	Anchura [min]	Área mAv	Área %	Nombre
1	12.037		0.0000	0.0000	0.0000	Insulina
2	13.592	BV	0.8889	2312.6233	10.6792	?
3	14.847	VV	0.6827	4566.5156	20.6619	?
4	15.491	VV	0.2443	6643.3703	29.8418	?
5	16.095	VV	0.2740	2566.9335	11.7581	?
6	16.391	VV	0.3004	4863.6533	21.8542	?
7	16.802	VV	0.6900	1752.4754	8.0547	?
8	19.298	VP	0.5504	1057.6239	4.7510	?

Total : 2.1757264

Resultados obtenidos con un integrador mejorado:

1 Avisos o Errores:

Advertencia: No se han encontrado los compuestos calibrados

*** Fin del Informe ***

Fig. 2

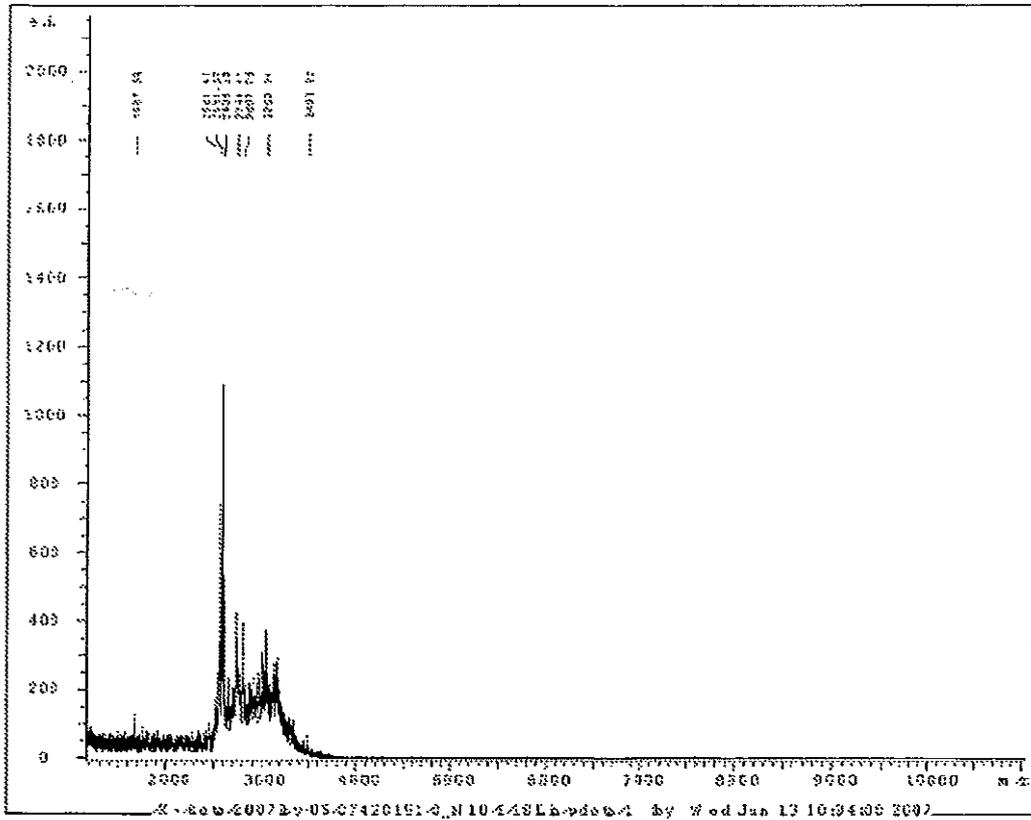


Fig. 3

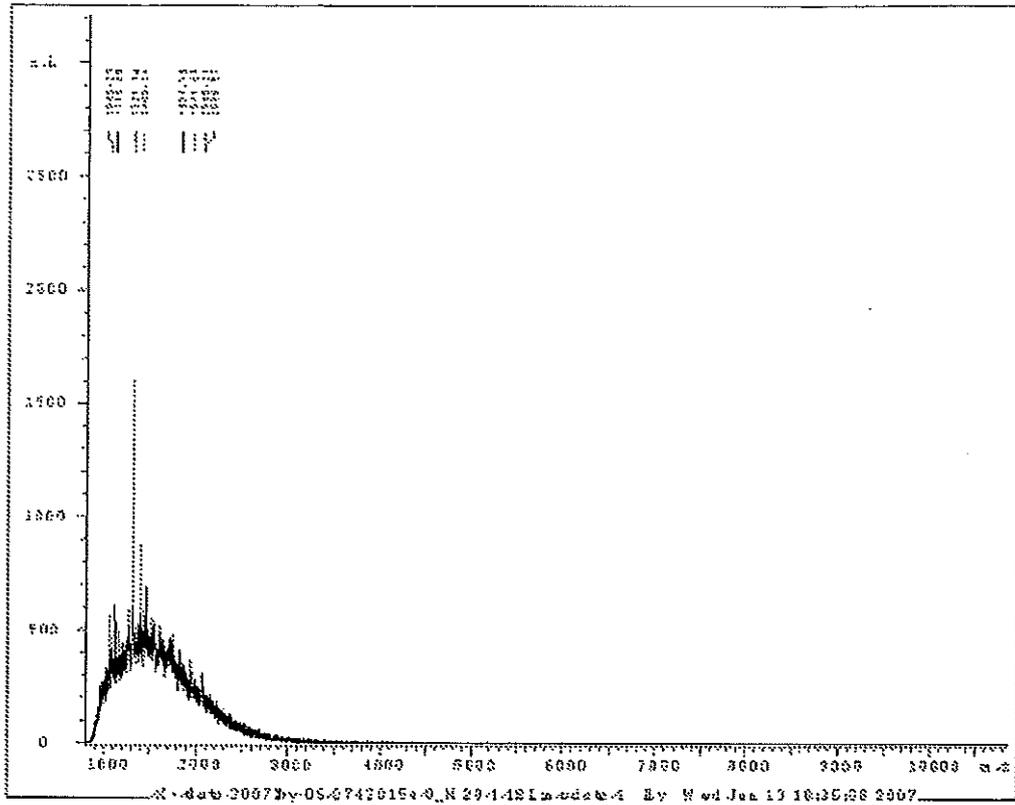


Fig. 4