

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 341**

51 Int. Cl.:

C07C 39/21 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01)
A61K 36/71 (2006.01)
A61K 36/28 (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01)
C07C 67/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2010 E 10791704 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2445859**

54 Título: **Procedimiento de aislamiento de cimirracemato A**

30 Prioridad:

21.06.2009 US 218962 P

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

05.12.2014

73 Titular/es:

BAGI RESEARCH LIMITED (50.0%)
Suite 4002, Jardine House, 1, Connaught Place
Central
Hong Kong , CN y
VERSITECH LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

YANG, LAI HUNG, CINDY y
LAU, ALLAN, SY

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 524 341 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

Procedimiento de aislamiento de cimirracemato A

Antecedentes de la técnica

5 Se han usado varias especies de *Cimicifuga* como agentes terapéuticos para enfermedades inflamatorias en la medicina china, coreana y japonesa. Igualmente, las composiciones que contiene el cohosh negro, conocida en botánica como *Cimicifuga racemosa* L. Nutt (también *Actaea racemosa*), son ampliamente usadas como suplementos dietéticos a base de hierbas en Estados Unidos y Europa. Históricamente, las mujeres nativas americanas usaban cohosh negro para el tratamiento del malestar, malaria, reumatismo, función renal anormal, dolor de garganta, irregularidades menstruales y enfermedades asociadas con el parto (Blementhal y col., 2000).
10 En los países asiáticos, esta hierba y otras especies de *Cimicifuga* incluyendo *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim., *Cimicifuga foelida* L., y *Cimicifuga heracleifolia* Kom. se usan para tratar la inflamación, fiebre, dolor de cabeza, dolor, dolor de garganta y escalofríos (Foster, 1999; Kusano, 2001; Kim y col., 2004). Sin embargo, todavía se desconocen plenamente los mecanismos de acción subyacentes de estas hierbas.

15 Se han investigado previamente las actividades biológicas del cohosh negro. Se demostró que los extractos de cohosh negro *in vivo*, inhiben la reacción de anafilaxia cutánea pasiva inducida por anti-IgE en ratas Sprague Dawley de una manera dependiente de la dosis (Kim y col., 2004). Los extractos de hierbas *in vitro* inhiben la transcripción de citoquinas incluyendo IL-4, IL-5 y TNF- α por medio de agentes inflamatorios tales como PMA y A2387 en mastocitos de leucemia humana HMC-1 (Kim y col., 2004). Otros estudios también demostraron los efectos inhibitorios del extracto de cohosh negro en histamina, bradiquinina y COX-2 mediada por acciones inflamatorias (Kim y Kim, 2000). Sin embargo, la componentes activos presentes en el extracto son desconocidos.

20 El cimirracemato A es el éster formado entre ácido isoferúlico y 3-(30, 40-dihiroxilfenil) -2-ketopropanol (Chen y col., 2005). El cimirracemato A es un compuesto de origen natural que posee un esqueleto 1,7-diarilo. Otros compuestos con este esqueleto 1,7-diarilo tienen actividades biológicas significativas (Roughley y Whiting, 1973). Por ejemplo, se ha reseñado que la curcumina, un pigmento natural aislado de *Curcuma longa* inhibe el crecimiento de varios tipos de células malignas (Chen y col., 1999; Aggarwal y col., 2004) y, especialmente, en el caso del infección por VIH (Vlietinck y col., 1998). La yakuchinona B extraída de semillas de *Alpina oxyphylla* (Itokawa y col., 1982) es activa contra la hipercolesterolemia y la aterosclerosis (Ohishi y col., 2001).

He y col., Journal of Chromotography A, 2006, Vol. 1112, págs. 241 – 254, desvela una extracción de material vegetal de *Cimicifuga* que usa metanol al 75%.

30 Chen et., Phytochemistry, 2002, vol. 61, págs. 409 - 413 desvela el aislamiento de varios cimirracematos por extracción con metanol.

Burdette y col., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, vol. 50, págs. 7022 - 7028 desvela la extracción de raíces de *Cimicifuga racemosa* por percolación con metanol. El extracto de metanol se fracciona posteriormente mediante particiones sucesivas con acetato de etilo y n-butanol.

35 Se ha descubierto que el cimirracemato A suprime TNF- α inducida por LPS en macrófagos humanos e inhibe las actividades de la MAP quinasa inducida por LPS, así como la activación de factores de transcripción específicos. Además, el cimirracemato A puede tener beneficios adicionales para la salud, incluyendo eliminadores de especies reactivas del oxígeno (Burdette y col., 2002). Tomados en conjunto, los compuestos, como cimirracemato A, con esqueleto 1,7-diarilo, pueden tener múltiples bioactividades que pueden actuar a través de múltiples mecanismos dependientes de células.
40

La *C. racemosa* ha estado experimentando un aumento espectacular en el consumo en Estados Unidos y Europa. Sus productos se preparan en forma de extractos isopropanólicos y etanólicos actualmente disponibles para los consumidores en una variedad de formulaciones y dosificaciones. El uso de esta hierba ha sido a base de extractos, en lugar de los componentes bioactivos individuales. Aunque se han aislado algunos compuestos de *C. racemosa*, incluyendo glucósidos triterpénicos y fenólicos, sus bioactividades y presencia constante en los extractos todavía tienen que determinarse (Kennelly y col., 2002).
45

Otro componente aislado *C. racemosa* es 23-epi-26- desoxiacteína. El componente 23-epi-26-desoxiacteína se usa actualmente en forma de marcador químico para normalizar productos de *C. racemosa* comerciales. La razón de su uso es su abundancia en el extracto (Pepping, 1999). Por lo tanto, el marcador químico usado para la normalización de los extractos de *C. racemosa* no es necesariamente representativo de la bioactividad de esta hierba.
50

Muchas especies diferentes de *cimicifuga* se usan tradicionalmente para curar la inflamación; sin embargo, como

se indica en la figura 10, sus componentes químicos son relativamente diferentes en las mismas condiciones de análisis. Aunque se han desarrollado procedimientos diferentes para distinguir las especies de *Cimicifuga* usando el enfoque de huellas (He y col., 2006; Li et al, 2002.), la complejidad y la variación de los componentes químicos de las hierbas limitan su uso en la identificación de especies.

- 5 Por lo tanto, existe la necesidad de extracción y aislamiento de cimirracemato A para su uso posterior como agente terapéutico. Además, existe la necesidad de un marcador bioactivo que se pueda usar para identificar los elementos del género *Cimicifuga*, por ejemplo: *C. racemosa*, *C. dahurica* (Turcz.) Maxim., *C. foetida* L. y *C. heracleifolia* Kom. De forma ideal, el marcador bioactivo también se puede usar para normalizar extractos de especies de *Cimicifuga* para su uso en forma de agentes anti-inflamatorios para el tratamiento de enfermedades asociadas a la inflamación y para distinguir las especies en base al perfil químico de cada muestra.

Breve resumen

15 La presente invención proporciona materiales y procedimientos para aislar y extraer cimirracemato A de una especie *Cimicifuga* de acuerdo con las reivindicaciones anexas. El cimirracemato A aislado se puede usar en forma de composición terapéutica y / o en forma de suplemento dietético. Además, el cimirracemato A aislado se puede usar en forma de marcador químico bioactivo y normalizado para varias especies de *Cimicifuga*.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para purificar cimirracemato A, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una cantidad suficiente de material de una especie de *Cimicifuga*;
- b) moler la materia prima;
- 20 c) mezclar el material molido con un disolvente polar acuoso a una temperatura de 20°C a 28°C para obtener un extracto de disolvente que comprende cimirracemato A, en el que el disolvente polar acuoso es agua o agua-etanol que comprende etanol a una concentración de menos del 20%; y
- d) aislar el cimirracemato A.

25 De forma ventajosa, la presente invención proporciona rendimientos más altos y más constantes de cimirracemato A aislado partir de especies de *Cimicifuga*. El novedoso procedimiento de aislamiento de la presente invención también es más rápido y conveniente.

30 Se proporciona cimirracemato A aislado para su uso en el tratamiento de, por ejemplo, malestar, malaria, reumatismo, función renal anormal, dolor de garganta, irregularidades menstruales, enfermedades asociadas con el parto, fiebre, dolor de cabeza, escalofríos y así como los síntomas y / o síndromes asociados con estas afecciones.

Además, se proporciona cimirracemato A aislado que se puede usar en forma de agente anti-inflamatorio.

En una realización adicional, se pueden distinguir varias especies del género *Cimicifuga*. Los extractos de las diversas especies de *Cimicifuga* crean perfiles químicos individuales para la bioactividad del cimirracemato A.

35 En un aspecto, el cimirracemato A se puede usar en forma de marcador químico para normalizar productos de *C. racemosa* disponibles en el mercado. El uso de cimirracemato A en forma de marcador químico para normalizar productos de *C. racemosa* puede ser, por ejemplo, en base a la bioactividad de cimirracemato A en forma de agente anti-inflamatorio.

40 De forma ventajosa, mediante el uso del procedimiento de extracción mejorado de la presente invención es posible distinguir diferentes especies de *cimicifuga* y normalizar extractos usando cimirracemato A en forma de marcador químico para el uso potencial bioactivo de estas hierbas o productos relacionados como terapias alternativas o suplementos dietéticos.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** es una estructura química de cimirracemato A.

45 La **Figura 2** muestra cromatogramas de las raíces de *C. racemosa* extraídas con Milli-Q-etanol a una relación de (1) 100:0, (2) 80:20, (3) 60:40, (4) 40:60, (5) 20:80 y (6) 0:100. * Indica la presencia de cimirracemato A en las muestras de *C. racemosa* en diferentes condiciones de extracción. Se obtuvieron los cromatogramas mediante inyección de las muestras a una cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (Lichrospher 100 RP C18 CE 5 μ , 250x4,6 mm DI) usando elución en gradiente de CH₃CN al 15% a CH₃CN al 100%, a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹ y la longitud de onda de detección era a 210 nm.

La **Figura 3** muestra los cromatogramas de los extractos obtenidos mediante la extracción de las raíces de *C. racemosa* con Milli-Q a (1) temperatura ambiente, (2) 50°C y (3) 100°C. * Indica la presencia de cimirracemato A de las muestras de *C. racemosa* en diferentes condiciones de extracción. Se obtuvieron los cromatogramas mediante inyección de las muestras a una cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (Lichrospher 100 RP C18 CE 5 μ , 250x4,6 mm DI) usando elución en gradiente de CH₃CN al 15% a CH₃CN al 100%, a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹ y la longitud de onda de detección era a 210 nm.

La **Figura 4** muestra cromatogramas de las raíces de *C. racemosa* extraídas con mili-Q por sonicación durante (1) 0 min, (2) 5 min, (3) 10 min, (4) 20 min y (5) 30 min. * Indica la presencia de cimirracemato A en las muestras de *C. racemosa* en diferentes condiciones de extracción. Se obtuvieron los cromatogramas mediante la inyección de las muestras a una cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (Lichrospher 100 RP C18 CE 5 μ , 250x4,6 mm DI) usando elución en gradiente de CH₃CN al 15% a CH₃CN al 100%, a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹ y la longitud de onda de detección era a 210 nm.

La **Figura 5** muestra los cromatogramas de las raíces de *C. racemosa* extraídas con mili-Q a la relación de (1) 1: 5 (p / v), (2) 1:10 (p / v), (3) 1:15 (p / v) y (4) 1:20 (p / v). * Indica la presencia de cimirracemato A en las muestras de *C. racemosa* en diferentes condiciones de extracción. Se obtuvieron los cromatogramas mediante la inyección de las muestras a una cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (Lichrospher 100 RP C18 CE 5 μ , 250x4,6 mm DI) usando elución en gradiente de CH₃CN al 15% a CH₃CN al 100%, a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹ y la longitud de onda de detección era a 210 nm.

La **Figura 6** muestra el efecto del disolvente de extracción en el rendimiento de extracción del cimirracemato A (n = 3). Condición experimental: La hierba (2,0 g) se extrajo por sonicación durante 30 min a temperatura ambiente y la extracción se repitió tres veces. Las diferentes letras por encima de las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p <0,05, ANOVA de una vía).

La **Figura 7** muestra el efecto de la temperatura en el rendimiento de extracción de cimirracemato A (n = 3). Condiciones experimentales: la cantidad de hierba de 2,0 g; el tiempo de extracción de 30 min; el agua Milli-Q del disolvente de extracción (10 ml). Las diferentes letras por encima de las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p <0,05, ANOVA de una vía).

La **Figura 8** muestra el efecto del tiempo de extracción en el rendimiento de extracción de cimirracemato A (n = 3). Condiciones experimentales: La hierba (2,0 g) se extrajo con agua Milli-Q a temperatura ambiente. Las diferentes letras por encima de las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p <0,05, ANOVA de una vía).

La **Figura 9** muestra el efecto del volumen de disolvente en el rendimiento de extracción de cimirracemato A (n = 3). Condiciones experimentales: La hierba (2,0 g) se extrajo con agua Milli-Q durante 30 min a temperatura ambiente. La extracción se repitió tres veces. Las diferentes letras por encima de las barras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p <0,05, ANOVA de una vía).

La **Figura 10A-C μ** muestra las huellas cromatográficas de *C. dahurica*, *C. foetida* y *C. heracleifolia*. * Indica la presencia de cimirracemato A en las muestras. Los cromatogramas se obtuvieron mediante inyección de las muestras a una cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (Lichrospher 100 RP C18 CE 5 μ , 250x 4,6 mm DI) usando elución en gradiente de CH₃CN al 15% a CH₃CN al 100%, a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹ y la longitud de onda de detección era a 210 nm.

40 Descripción detallada

La presente invención proporciona materiales y procedimientos para aislar y extraer cimirracemato A de varias especies de *Cimicifuga* de acuerdo con las reivindicaciones anexas. De acuerdo con la presente invención, el cimirracemato A aislado se puede usar en forma de composición terapéutica o suplemento dietético. Además, el cimirracemato A aislado se puede usar en forma de marcador químico bioactivo y normalizado para diversas especies de *Cimicifuga*.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para purificar cimirracemato A, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una cantidad suficiente de materia prima de una especie *Cimicifuga*;
- b) moler la materia prima hasta un polvo;
- c) mezclar el polvo con un disolvente polar acuoso a una temperatura de 20°C a 28°C para obtener un extracto de disolvente que comprende cimirracemato A, en el que el disolvente polar acuoso es agua o agua-etanol que comprende etanol a una concentración de menos del 20%; y

d) aislar cimirracemato A.

En realizaciones específicas, la especie *Cimicifuga* se selecciona de *Cimicifuga racemosa*, *Cimicifuga foetida*, y / o *Cimicifuga heracleifolia*. En una realización preferida, la especie *Cimicifuga* es *Cimicifuga racemosa*.

5 El procedimiento de extracción de la presente invención usa un disolvente polar acuoso, que es agua o agua-etanol que comprende etanol a una concentración de menos del 20%. Preferiblemente puede ser etanol a menos del 15%, e incluso menos del 10%, o incluso menos del 5%.

10 En una realización preferida, la presente invención usa una relación de *Cimicifuga racemosa* a agua de entre 1 : 5 y 1 : 20, y preferiblemente aproximadamente 1 : 15. Además, el procedimiento de extracción se lleva a cabo a una temperatura de 20°C a 28°C. En una realización específica el procedimiento de extracción se lleva a cabo a aproximadamente 25°C.

De forma ventajosa, la presente invención proporciona rendimientos más altos y más constantes de cimirracemato A aislado de la especie *Cimicifuga*. La presente invención también proporciona un procedimiento más rápido y conveniente para aislar cimirracemato A.

15 El cimirracemato A aislado se proporciona para su uso en el tratamiento de, por ejemplo, malestar, malaria, reumatismo, función renal anormal, dolor de garganta, irregularidades menstruales, enfermedades asociadas con el parto, fiebre, dolor de cabeza y escalofríos.

Además, el cimirracemato A aislado se proporciona de tal forma que se puede usar en forma de agente anti-inflamatorio.

20 Además el cimirracemato A aislado se proporciona de tal forma que se puede usar para suprimir TNF α inducida por LPS en macrófagos humanos, inhibe las actividades de la MAP quinasa inducida por LPS, o actúa en forma de eliminador de especies reactivas del oxígeno.

25 El término "sujeto", como se usa en la presente memoria descriptiva, describe un organismo, incluyendo mamíferos tales como primates. Las especies de mamíferos que se pueden beneficiar incluyen, pero no están limitadas a, simios, chimpancés, orangutanes, seres humanos, monos; y animales domésticos tales como perros, gatos, caballos, ganado vacuno, cerdos, ovejas, cabras, pollos, ratones, ratas, cobayas y hámsteres.

En una realización adicional, es posible distinguir varias especies del género *Cimicifuga*. Los extractos de las diversas especies de *Cimicifuga* crean perfiles químicos individuales para la bioactividad del cimirracemato A después de HPLC.

30 En un aspecto, el cimirracemato A aislado de la presente invención se puede usar en forma de marcador químico para normalizar los productos de *C. racemosa* disponibles en el mercado. El uso del cimirracemato A aislado en forma de marcador químico para normalizar productos de *C. racemosa* disponibles en el mercado, puede ser, por ejemplo, en base a la bioactividad de cimirracemato A en forma de agente anti-inflamatorio.

35 Se ha identificado el cimirracemato A en raíces y rizomas secos de cohosh negro. Este compuesto suprime los efectos inducidos por LPS incluyendo fosforilación de quinasa específica, activación del factor de transcripción y producción de TNF- α en macrófagos humanos primarios (Solicitud de Patente de EE.UU. N° 61/143.925, presentada el 12 de enero de 2009).

40 La extracción de la muestra es la primera etapa crucial para la extracción de las cantidades máximas de los componentes químicos deseados de materiales a base de hierbas. Durante los últimos años, se han usado algunas técnicas modernas, como el análisis *headspace*, extracción de fluidos supercríticos y subcríticos, extracción asistida por microondas y extracción de líquido presurizado, para la preparación cuantitativa en el análisis de plantas medicinales (Huie, 2002). Aunque estos procedimientos tienen ventajas significativas sobre los procedimientos convencionales reduciendo el consumo de disolventes orgánicos, eliminando la limpieza de las muestras y etapas de concentración, y mejorando la eficiencia de la extracción de las hierbas, tienen importantes limitaciones. Por ejemplo, el análisis *headspace* y la extracción de fluidos supercríticos y subcríticos sólo fijan como diana los aceites esenciales de hierbas, mientras que las extracciones de líquidos presurizados se llevan a cabo a temperaturas elevadas que pueden llevar a la degradación térmica. Por lo tanto, es conveniente desarrollar un protocolo de extracción mejorado para aumentar a escala la producción de compuestos específicos de las hierbas.

50 De forma ventajosa, los procedimientos de la presente invención proporcionan rendimientos altos y constantes de cimirracemato A extraído de cohosh negro. Una ventaja adicional de los procedimientos de la presente invención es que son rápidos y prácticos en la preparación de muestras para usos farmacéuticos.

Las condiciones de extracción para el cimirracemato A se han mejorado de acuerdo con la presente invención cambiando los parámetros de extracción entre los que se incluye la temperatura, disolvente de extracción, tiempo de extracción y volumen de disolvente. También se han identificado que las condiciones de HPLC aumentan el porcentaje de cimirracemato A obtenido a partir de los extractos.

- 5 De forma adicional, por medio del uso de los procedimientos de extracción y condiciones de HPLC como se establecen en la presente memoria descriptiva, es posible establecer patrones para caracterizar productos a base de hierbas con bioactividades específicas.

Además, el cimirracemato A aislado de acuerdo con la invención se puede usar para identificar los elementos del género *Cimicifuga*, por ejemplo: *C. racemosa*, *C. dahurica* (Turcz.) Maxim., *C. foetida* L., y *C. heracleifolia* Kom. El cimirracemato A también se puede usar para normalizar extractos de especies de *Cimicifuga* para su uso en forma de agentes anti-inflamatorios para el tratamiento de enfermedades asociadas a la inflamación. El cimirracemato A también se puede usar para distinguir especies basadas en el perfil químico de cada muestra en base a, por ejemplo, la relación del cimirracemato A a otros compuestos en la muestra.

Selección del disolvente

- 15 Los disolventes polar, no tóxicos, entre los que se incluye agua y etanol (y mezclas de los mismos), se usaron para extraer cimirracemato A partir de *C. racemosa*. Este sistema de disolvente es adecuado en la extracción de diferentes polaridades de los componentes activos, así como aceptable para el consumo humano. Entre los disolventes usados, agua y etanol al 20%, o menos, produjeron la mayor cantidad de cimirracemato A.

Temperatura de extracción

- 20 La selección de la temperatura de extracción también es crucial para la extracción de una mayor cantidad de cimirracemato A de *C. racemosa* de acuerdo con la presente invención. Se reseñó un aumento de la temperatura que aumentaba significativamente la difusividad al romper los enlaces de interacción soluto - matriz y aumentaba la volatilidad del soluto (Loncin y Merson 1979). Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, se determinó que el rendimiento de la extracción de cimirracemato A disminuye al aumentar la temperatura más allá de la temperatura ambiente. Esto indicó que la movilización del cimirracemato A de las hierbas se puede producir a temperatura ambiente (por ejemplo 25°C) seguido de su posible pérdida debido a la descomposición a temperaturas más altas. Así pues, de acuerdo con la presente invención, la temperatura ambiente es la temperatura de extracción preferida para la extracción de cimirracemato A de *C. racemosa*.

Tratamiento de sonicación

- 30 La sonicación es otro procedimiento que, en algunos casos, puede mejorar la eficiencia y reducir el tiempo de extracción para extraer compuestos a partir de material seco de hierbas. El mecanismo subyacente de potenciación es la intensificación de transferencia de masa y un acceso más fácil del disolvente al material seco de hierbas (Vinatoru, 2001; Shotipruk y col., 2001). En situaciones analíticas, la sonicación es una alternativa rápida, económica y eficiente a las técnicas de extracción convencionales y, en algunos casos, incluso a la extracción de fluidos supercríticos y asistida por microondas (Luque-García y col., 2003). Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, se descubrió que la sonicación no mejoraba el rendimiento de extracción del cimirracemato A, cuando se compara con el uso de condiciones de maceración (Fig. 4 y 8).

- 40 Los resultados revelaron que el cimirracemato A se puede lixiviar a agua con facilidad a partir de los materiales a base de hierbas y no se requiere ninguna energía. Por lo tanto, la extracción de cimirracemato A de *C. racemosa* puede usar maceraciones frías.

Materiales y Procedimientos Experimentales

Instrumentos

- 45 Se usó un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento con detección por red de diodos serie Agilent 1200 (HPLC-DAD) (Palo Alto, CA, EE.UU.). Estaba equipado con un tomador de muestras automático G1367c, un desgasificador de vacío, una bomba binaria, un detector de DAD y una estación de trabajo de LC. Se usó un baño ultrasónico (JP Selecta, España) para la extracción de los compuestos de las hierbas.

Disolventes

- 50 El agua desionizada se obtuvo a partir de un sistema de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.) para la extracción de muestras y preparación de la fase móvil. El etanol (EtOH, Merck, Alemania) de grado analítico se usó para la preparación de soluciones convencionales y / o de la muestra. Se usó acetonitrilo (ACN, Tedia, EE.UU.) de grado HPLC para la preparación de la fase móvil.

Materiales vegetales

Se adquirió la materia prima de *Cimicifuga racemosa* de Monterey Bay Spice Company (Santa Cruz, EE.UU.) en mayo de 2008. Se molió el material hasta polvo, usando un molino (IKA, Alemania). A continuación, el polvo se mantuvo en un desecador y se usó en todos los experimentos.

5 Identificación de las condiciones de extracción preferidas

Efecto de la relación disolvente hidroalcohólico

10 Se extrajo *C. racemosa* (2 g) con 10 ml de EtOH al 0%, 20%, 40%, 60%, 80% y 100% (v / v) en agua. Las extracciones se realizaron por sonicación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron tres réplicas para cada disolvente. El proceso de extracción se repitió y los experimentos se realizaron tres veces. Los extractos se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 min y después se filtraron a través de un papel de filtro (n° 1, Advantec, Japón). El filtrado resultante se evaporó y se secó por congelación para para obtener el peso seco de los extractos.

Efecto de la temperatura de extracción

15 Se usaron tres temperaturas de extracción (temperatura ambiente, 50°C y 100°C) para estudiar el rendimiento de la extracción del cimirracemato A. El polvo secado de *C. racemosa* (2,0 g) se sonicó con 10 ml de agua Milli-Q en cada temperatura de extracción durante 30 min. Se realizaron tres réplicas para cada temperatura, y el proceso de extracción se repitió tres veces. Los extractos se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos y después se filtraron a través de un filtro de papel como anteriormente. Después, el filtrado resultante se secó por congelación con el fin de obtener el peso seco de los extractos.

Efecto del tiempo de sonicación

20 Se extrajo *C. racemosa* (2,0 g) con 10 ml agua Milli-Q a temperatura ambiente. Se realizaron extracciones por maceración y / o sonicación durante 5, 10, 20 y 30 minutos. Se realizaron tres réplicas para cada tiempo de extracción y el proceso de extracción se repitió tres veces. Los extractos se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos y después se filtraron a través de un papel de filtro como anteriormente. El filtrado resultante se evaporó y se secó por congelación para para obtener el peso seco de los extractos.

25 Efecto de la relación disolvente a hierba

30 Se extrajo *C. racemosa* (2,0 g) con Milli-Q a una relación de 1:5, 1:10, 1:15 y 1:20 (p / v) a temperatura ambiente con sonicación continua durante 30 minutos. Se realizaron tres réplicas para cada volumen de extracción y el proceso de extracción se repitió tres veces. Los extractos se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos y después se filtraron a través de un papel de filtro como anteriormente. El filtrado resultante se evaporó y se secó por congelación para para obtener el peso seco de los extractos.

Análisis de cuantificación

35 Los extractos secos se disolvieron en metanol (MeOH) (25 mg / ml) antes de que se determinaran por HPLC usando una columna Lichrospher 100 C₁₈ de fase inversa (250x4,6 mm d. i., 5 µm) (Alltech, EE.UU.). La separación se realizó por elución en gradiente lineal usando ACN (25% - 90% en 15 minutos) y agua Milli-Q (75% - 10% en 15 minutos). La velocidad de flujo era de 1,0 ml / min. La detección de la longitud de onda y temperatura de la columna se fijó en 210 nm y 23°C, respectivamente. El volumen de inyección era 5 µl. Esta condición de funcionamiento se optimizó para proporcionar la mejor separación de cimirracemato A partir de los otros picos de eluyente.

Extracción de *C. dahurica* (Turcz.) Maxim., *C. foetida* L., y *C. heracleifolia* Kom.

40 Se proporcionaron tres homólogos de *C. racemosa*: *C. dahurica* (Turcz.) Maxim., *C. foetida* L. y *C. heracleifolia* Kom. por Purapharm International (H. K.) Ltd. Cada hierba (2,0 g) se extrajo con 40 ml de agua Milli-Q bajo sonicación (30 minutos) a temperatura ambiente. El proceso de extracción se repitió tres veces y se realizaron tres réplicas para cada hierba. Los extractos acuosos se secaron por congelación y después se disolvieron en MeOH para obtener la concentración final de 25 mg / ml. Las huellas de las hierbas, así como el porcentaje del rendimiento del cimirracemato A se determinaron mediante HPLC-PDA, como se ha descrito anteriormente.

45 Análisis estadístico

Se analizaron los datos usando el paquete estadístico SPSS. Se controló la normalidad de las diferencias del rendimiento de extracción del cimirracemato A entre las condiciones de extracción usando la Prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianza usando la Prueba C de Cochran. A continuación, se compararon usando

ANOVA de una vía seguido de Prueba de Tukey. En todos los casos, el umbral de significación fue del 5%.

Los siguientes son ejemplos que ilustran los procedimientos para la práctica de la presente invención.

Ejemplo 1 - Optimización del aislamiento y extracción de cimirracemato a

5 Optimización de las condiciones de HPLC

Por medio del uso de un esquema de identificación y fraccionamiento guiado por bioensayo, el cimirracemato A (Fig. 1) con actividad anti-inflamatoria se aisló a partir del extracto acuoso de *C. racemosa*. Con el fin de cuantificar el cimirracemato A de cada extracto, se obtuvo una curva de calibración que variaba de 0,15625 a 1,25 µg / µl ($y = 9197,4x - 12.457$, $R^2 = 0,9993$).

10 Optimización de las condiciones de extracción

Efecto de la relación disolvente hidroalcohólico

Los rendimientos porcentuales del cimirracemato A en *C. racemosa* en relación con el contenido de etanol en el disolvente de la extracción se muestran en la figura 2 y 6. Como se muestra en la figura 2, el pico del cimirracemato A (denotado como *) era el más alto a etanol al 0% (es decir, agua al 100%) y se redujo sustancialmente con el aumento del contenido de etanol. El rendimiento de la extracción del cimirracemato A disminuyó del 1,36% al 0,19% cuando el contenido de etanol aumentó del 0% al 100% (Fig. 6). Los resultados indicaron que el contenido de etanol afecta a la extracción de cimirracemato A de *C. racemosa*, disminuyendo la eficacia de la extracción con el aumento del contenido de etanol en el disolvente de extracción. Por lo tanto, se usó agua como disolvente de la extracción para investigaciones adicionales.

20 Efecto de la temperatura de la extracción

Con el fin de investigar cómo la temperatura afecta al rendimiento de la extracción del cimirracemato A, se extrajo *C. racemosa* bajo tres condiciones térmicas diferentes: temperatura ambiente, 50°C y 100°C. En la fig. 3, se muestran los cromatogramas de los extractos obtenidos a partir de la condición de HPLC optimizada. El pico del cimirracemato A (denotado como *) era el más alto a temperatura ambiente y se redujo sustancialmente desde temperatura ambiente hasta 50°C y luego a 100°C (Fig. 3). Además, los rendimientos de la extracción del cimirracemato A a temperatura ambiente, 50°C y 100°C fueron del 1,24%, 0,51% y 0,11%, respectivamente (Fig. 7). Los resultados indicaron que la temperatura afecta al rendimiento de la extracción del cimirracemato A de forma significativa (prueba de Tukey, $p < 0,05$) y la eficacia de la extracción del cimirracemato A disminuye sustancialmente con el aumento de la temperatura. Por lo tanto, se eligió la temperatura ambiente para investigaciones adicionales.

30 Efecto del tiempo de sonicación

En las figuras 4 y 8 se presenta el porcentaje del rendimiento del cimirracemato A extraído de *C. racemosa* sometido a diferentes tiempos de sonicación. En la figura 4, los picos del cimirracemato A aparecieron en todos los extractos con intensidad similar. Se determinó que el porcentaje del rendimiento del cimirracemato A era del 1,20%, 0,96%, 1,39%, 1,56%, y 1,34% con tiempo de sonicación durante 0, 5, 10, 20, y 30 min (Fig. 8), respectivamente. Nuestros resultados indicaron que la sonicación no aumentaba de forma significativa el rendimiento de extracción del cimirracemato A (prueba de Tukey, $p > 0,05$).

Efecto de la relación disolvente a hierba

El efecto del volumen del disolvente en la eficacia de la extracción del cimirracemato A de *C. racemosa* se determinó mediante la extracción de las hierbas con Milli-Q en una relación de 1:5, 1:10, 1:15 y 1:20 (p / v). Los resultados mostraron que la intensidad pico del cimirracemato A obtenida de 1:15 y 1:20 (p / v) era más alta que las otras dos relaciones (Fig. 5). En la fig. 9, se determinó que el porcentaje del rendimiento del cimirracemato A era del 0,98%, 0,93%, 1,68%, y 1,52% a una relación de 1:5, 1:10, 1:15 y 1:20 (p / v) de agua, respectivamente. Los resultados revelaron que la relación de *C. racemosa* a agua debe ser superior a 1:15 (p / v) con el fin de obtener un rendimiento de extracción del cimirracemato A más alto.

Ejemplo 2 - Aislamiento del cimirracemato a y toma de huellas para determinar la identidad y bioactividad de especies de cimicífuga

Determinación del cimirracemato A de *C. dahurica*, *C. foetida*, y *C. heracleifolia*

Las huellas de referencia de *C. dahurica*, *C. foetida*, y *C. heracleifolia* se determinaron mediante la extracción de las

5 hierbas bajo la misma condición de extracción optimizada y llevando a cabo después el mismo ajuste de HPLC que para el cohosh negro. Los resultados mostraron que *C. dahurica* no contenía cimirracemato A, mientras que *C. foetida*, y *C. heracleifolia* contenían diferentes niveles de cimirracemato A, como se muestra en la figura 10. En general, usando la misma extracción optimizada y condiciones de HPLC, es fácil identificar el compuesto de hierbas sin procesar de *C. racemosa* como así como sus homólogos, a saber, *C. foetide* y *C. heracleifolia*.

Ejemplo 3 - Usos terapéuticos del cimirracemato a

10 Los compuestos de la presente invención se pueden usar para tratar la inflamación asociada con la infección, incluyendo, pero no limitado a, infecciones por virus, bacterias, hongos, levaduras, y otros microbios. Adicionalmente, los compuestos de la presente invención se pueden usar para tratar la inflamación mediada por una variedad de factores proinflamatorios incluyendo, pero no limitado a, factor de necrosis tumoral, interferones, interleucinas, leucotrienos, y toxinas ambientales.

15 Los compuestos y composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar en el tratamiento, o mejora, de los síntomas inflamatorios en cualquier enfermedad, afección o trastorno en los que es beneficiosa la supresión de la inflamación y / o inmune. Las enfermedades, afecciones o trastornos inflamatorios en los que se pueden usar los compuestos y composiciones de la presente invención para inhibir las reacciones inmunes y la inflamación no deseadas incluyen, pero no se limitan a, artritis, incluyendo pero no limitado a artritis reumatoide, y otras enfermedades, afecciones o trastornos de las articulaciones o el sistema musculoesquelético en los que es beneficiosa la supresión de la inflamación y / o inmune.

20 Además, los compuestos y composiciones también son útiles para tratar o mejorar la inflamación asociada con la aterosclerosis; arteriosclerosis; enfermedad cardiaca aterosclerótica; lesión por reperfusión; paro cardiaco; infarto de miocardio; trastornos inflamatorios vasculares incluyendo enfermedad cerebrovascular (accidente cerebrovascular); síndrome de dificultad respiratoria y otras enfermedades, afecciones o trastornos cardiopulmonares, en los que sería beneficiosa la supresión de la inflamación y / o inmune, tales como la enfermedad de injerto contra huésped y afecciones alérgicas.

25 Además, los compuestos y composiciones también son útiles para tratar o mejorar la inflamación asociada con la úlcera péptica; colitis ulcerosa, enfermedad de Chron, síndrome del intestino irritable, otras afecciones inflamatorias intestinales, y otras enfermedades, afecciones o trastornos del tracto gastrointestinal en los que sería beneficiosa la supresión de la inflamación inmune; fibrosis hepática; cirrosis hepática y otras enfermedades, afecciones o trastornos hepáticos en los que sería beneficiosa la supresión de la inflamación y / o inmune; tiroiditis y otras enfermedades, afecciones o trastornos glandulares, en los que sería beneficiosa la supresión de la inflamación y / o inmune; glomerulonefritis y otras enfermedades, afecciones o trastornos renales y urológicos, en los que sería beneficiosa la supresión de la inflamación y / o inmune.

35 Además, los compuestos y composiciones también son útiles para tratar o mejorar la inflamación asociada con la inflamación post-traumática; choque séptico; enfermedades infecciosas en las que sería beneficiosa la supresión de la inflamación y / o inmune; complicaciones inflamatorias y efectos secundarios de la cirugía en los que sería beneficiosa la supresión de la inflamación y / o inmune; trasplante de médula ósea y otras complicaciones de los trasplantes y / o efectos secundarios en los que sería beneficiosa la supresión de la inflamación y / o inmune; complicaciones inflamatorias y / o inmunes y efectos secundarios de la terapia génica, por ejemplo, debido a la infección con un portador viral; e inflamación asociada con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

40 Además, los compuestos y composiciones también son útiles para para inhibir aspectos relacionados con macrófagos o linfocitos T de una respuesta inmune que no están asociados con la inflamación. Los compuestos y composiciones son capaces de inhibir las actividades de macrófagos o linfocitos T, incluyendo, pero no limitado a, la actividad presentadora de antígenos de macrófagos, producción de citocinas de macrófagos, producción de citoquinas de linfocitos T, actividad de adhesión de linfocitos T, proliferación de linfocitos T, etc. Así pues, los péptidos, derivados de péptidos y composiciones son útiles para suprimir o inhibir una respuesta inmune humoral y / o celular.

Los compuestos y composiciones también son útiles para tratar o mejorar enfermedades proliferativas de monocitos y leucocitos, por ejemplo, leucemia, mediante la reducción de la cantidad de monocitos y linfocitos.

50 Los compuestos y composiciones farmacéuticas de la invención son además útiles para la prevención y / o el tratamiento del rechazo de injerto en casos de trasplante de las células, tejidos y órganos naturales o artificiales, tales como córnea, médula ósea, órganos, lentes, marcapasos, tejido de la piel natural y artificial, y similares.

Los compuestos y composiciones también son útiles para tratar o mejorar la inflamación asociada con hipersensibilidad; reacciones alérgicas; asma; lupus eritematoso sistémico; enfermedades del colágeno y otras enfermedades, afecciones o trastornos autoinmunes en los que la supresión de la inflamación y / o inmune es

beneficiosa.

Los compuestos y composiciones también son útiles para tratar o mejorar la inflamación asociada con la otitis y otras enfermedades, afecciones o trastornos otorrinolaringológicos en los que sería beneficiosa la supresión de la inflamación y / o inmune; dermatitis y otras enfermedades, afecciones o trastornos cutáneos en los que sería beneficiosa la supresión de la inflamación y / o inmune; enfermedades periodontales y otras enfermedades, afecciones o trastornos dentales en los que sería beneficiosa la supresión de la inflamación y / o inmune.

Además, los compuestos y composiciones también son útiles para tratar o mejorar la inflamación asociada con uveítis posterior; uveítis intermedia; uveítis anterior; conjuntivitis; coriorretinitis; uveorretinitis; neuritis óptica; inflamación intraocular, tal como retinitis y edema macular cistoide; oftalmía simpática; escleritis; retinitis pigmentosa; componentes inmunes e inflamatorios de la enfermedad degenerativa del fondo de ojo; componentes inflamatorios del trauma ocular; inflamación ocular causada por la infección; vitreorretinopatías proliferativas; neuropatía óptica isquémica aguda; cicatrización excesiva, por ejemplo, después de la operación de filtración del glaucoma; reacción de la inflamación y / o inmune contra implantes oculares y otras enfermedades, afecciones o trastornos oftálmicos relacionados con la inflamación en los que sería beneficiosa la supresión de la inflamación y / o inmune.

Además, los compuestos y composiciones también son útiles para tratar o mejorar la inflamación asociada con enfermedades y afecciones o trastornos autoinmunes en los que, tanto en el sistema nervioso central (SNC) y en cualquier otro órgano, sería beneficiosa la supresión de la inflamación y / o inmune; enfermedad de Parkinson; complicaciones y / o efectos secundarios del tratamiento de la enfermedad de Parkinson; complejo de demencia relacionado con el SIDA (encefalopatía relacionada con el VIH); enfermedad de Devic; corea de Sydenham; enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades, afecciones o trastornos degenerativos del sistema nervioso central en los que sería beneficiosa la supresión de la inflamación y / o inmune; componentes inflamatorios de accidentes cerebrovasculares; síndrome postpolio; componentes inmunes e inflamatorios de trastornos psiquiátricos; mielitis; encefalitis; panencefalitis esclerosante subaguda; encefalomielitis; neuropatía aguda; neuropatía subaguda; neuropatía crónica; Síndrome de Guillain-Barre; corea de Sydenham; miastenia gravis; seudotumor cerebral; Síndrome de Down; enfermedad de Huntington; esclerosis lateral amiotrófica; compresión de los componentes inflamatorios del sistema nervioso central (CNS) o trauma del CNS o accidentes cerebrovasculares (apoplejía) o infecciones o hipoxia-isquemia del SNC; componentes inflamatorios de atrofas y distrofias musculares; y enfermedades, afecciones o trastornos relacionados con la inflamación e inmunes del sistema nerviosos periférico y central, en los que sería beneficiosa la supresión de la inflamación y / o inmune.

En otra realización mas, los compuestos y composiciones de la invención son útiles para restaurar el privilegio inmune en un sitio de privilegio inmune que ha perdido su privilegio inmune, tales como el cerebro, los ojos y los testículos.

Ejemplo 4 - Formulaciones

En una realización, la presente invención proporciona compuestos aislados. Como se usa en la presente memoria descriptiva, "aislado" se refiere a compuestos que han sido retirados de cualquier entorno en el que pueden existir por naturaleza. Por ejemplo, el cimirracemato A aislado no se refiere al compuesto del cimirracemato A tal como existe en *Cimicifuga racemosa*. En realizaciones preferidas, los compuestos de la presente invención son al menos puros al 75%, preferiblemente al menos puros al 90%, más preferiblemente puros más del 95%, y lo más preferiblemente son puros más del 99% (sustancialmente puro).

La presente invención también proporciona composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención en una forma que se puede combinar con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En este contexto, el compuesto puede ser, por ejemplo, aislado o sustancialmente puro. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra el compuesto. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de aceite de petróleo, tal como aceite mineral, aceite vegetal tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, y aceite de sésamo, aceite animal o aceite de origen sintético. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear en forma de vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Particularmente los vehículos farmacéuticos preferidos para el tratamiento o mejora de la inflamación en el sistema nervioso central son vehículos que pueden penetrar la barrera de la sangre / cerebro. Como se usa en la presente memoria descriptiva, los vehículos no incluyen materiales vegetales naturales tal como existen por naturaleza.

Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición terapéutica, en caso conveniente, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulgentes, o agentes

5 tamponadores de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, y similares. La composición se puede formular con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados están descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Dichas composiciones contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de composición terapéutica, junto con una cantidad adecuada de vehículo con el fin de proporcionar la forma para la administración apropiada para el paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

10 En una realización, la composición se formula de acuerdo con los procedimientos rutinarios en forma de una composición farmacéutica adaptada para la administración de inyección local a seres humanos. Típicamente, las composiciones para la administración de inyección local son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran ya sea por separado o mezclados en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o un sobre que indique la cantidad de agente activo. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de tal forma que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

20 Las composiciones terapéuticas o farmacéuticas de la invención se pueden formular en formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos amino libres tales como los derivados partir de ácidos clorhídricos, fosfóricos, acéticos, oxálicos, tartáricos, etc, y las formadas con grupos carboxilo libres tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, etanol 2-etilamino, histidina, procaína, etc

25 La presente invención también proporciona la modificación del compuesto de tal forma que es más estable una vez administrada a un sujeto, es decir, una vez administrada tiene un período de tiempo más largo de eficacia en comparación con en el compuesto no modificado. Tales modificaciones son bien conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, derivatización de polietilenglicol (PEGilación), microencapsulación, etc. En ejemplos específicos, un compuesto activo de la invención puede ser acoplado a los PEG de peso molecular grande o pequeño mediante el uso de un enlace. Los ejemplos anteriormente conocidos de tales construcciones incluyen PEG-irinotecan y PEG-docetaxel.

30 La cantidad de la composición terapéutica o farmacéutica de la invención que es eficaz en el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno particular dependerá de la naturaleza de la enfermedad, afección o trastorno y se puede determinar por medio de técnicas clínicas convencionales. En general, la dosis varía de aproximadamente 0,001 mg / kg a aproximadamente 2 mg / kg. Además, los ensayos in vitro se pueden emplear opcionalmente para ayudar a identificar intervalos de dosis óptimos. La dosis precisa para emplear en la formulación dependerá también de la vía de administración, y de la gravedad de la enfermedad, afección o trastorno, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del facultativo y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayos de modelos animales o in vitro. Por ejemplo, con el fin de obtener una dosis eficaz mg / kg para los seres humanos en base a los datos generados a partir de estudios en ratas, la dosis eficaz mg / kg en ratas se divide por seis.

40 La invención también proporciona un envase farmacéutico o kit que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes, por ejemplo, compuesto, vehículo, de las composiciones farmacéuticas de la invención.

45 Los compuestos de la presente invención también se pueden formular de acuerdo con las prácticas de la medicina tradicional china. La composición y dosificación de la formulación que son eficaces en el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno particular, dependerán de la naturaleza de la enfermedad, afección o trastorno por medio de técnicas clínicas convencionales.

50 La medicina tradicional china en la prescripción de cantidades se puede realizar fácilmente en cualquier forma de fármaco, adecuada para la administración a seres humanos o animales. Las formas adecuadas incluyen, por ejemplo, tinturas, decocciones, y extractos secos. Estas se pueden tomar por vía oral, aplicadas a través de inyección venosa o membranas mucosas. El ingrediente activo también se puede formular en cápsulas, polvo, gránulos, pastillas, supositorios, soluciones orales, inyecciones de suspensión gastrointestinal pasteurizada, cantidades grandes o pequeñas de inyección que incluyen preparaciones para administración intravenosa, inyecciones de polvo congelado, inyecciones de polvo pasteurizado y similares. Todos los procedimientos anteriormente mencionados son conocidos por las personas expertas en la técnica, se describen en los libros y se usan de forma común por los facultativos de la medicina a base de hierbas.

55

Una tintura se prepara suspendiendo hierbas en una solución de alcohol, tal como, para administración intravenosa, inyecciones de polvo congelado, inyecciones de polvo pasteurizado y similares. Todos los procedimientos anteriormente mencionados son conocidos por las personas expertas en la técnica, se describen en los libros y se usan de forma común por los facultativos de la medicina a base de hierbas.

- 5 Una tintura se prepara suspendiendo hierbas en una solución de alcohol, tal como, por ejemplo, vino o licores. Después de un período de suspensión, el líquido (la solución de alcohol) se administran por ejemplo, dos o tres veces al día, una cucharadita cada vez.

- 10 Una decocción es una forma común de la preparación a base de hierbas. Se prepara tradicionalmente en una olla de barro, pero puede también se puede preparar en recipientes de vidrio, esmalte o acero inoxidable. La formulación se puede poner a remojo en agua durante un período de tiempo y luego se lleva a ebullición y hierve a fuego lento hasta que la cantidad de agua se reduce, por ejemplo, a la mitad.

- 15 Un extracto es una preparación concentrada de los componentes esenciales de una hierba medicinal. Típicamente, los componentes esenciales se extraen de las hierbas por medio de la suspensión de las hierbas en un disolvente de elección apropiada, típicamente, agua, o mezcla de etanol / agua. El proceso de extracción se puede facilitar adicionalmente por medio de maceración, percolación, reperlación, extracción a contracorriente, turbo-extracción, o por extracción hipercrítica de dióxido de carbono (temperatura / presión). Después de la filtración, para deshacerse de los restos de hierba, la solución de extracción se puede evaporar adicionalmente y concentrarse así para producir un extracto blando, *extractum spissum*, y / o, finalmente, un extracto seco, *extracum siccum*, por medio de secado por pulverización, secado en horno de vacío, secado en lecho fluido o secado por congelación. El extracto blando o extracto seco se puede disolver adicionalmente en un líquido adecuado a una concentración deseada para la administración o procesar en una forma tal como pastillas, cápsulas, inyecciones, etc.
- 20

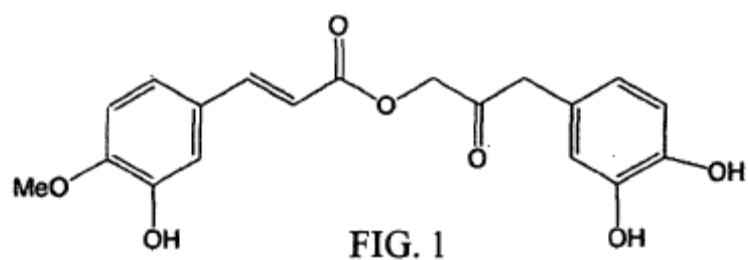
Referencias

- 25 1. Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, Aggarwal B. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. *Int J Cancer* 2004, 111: 679-92.
2. Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J (eds.): *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*. Newton, MA: Integrative Medicine Communications, 2000, pp 22-27.
- 30 3. Burdette JE, Chen SN, Lu ZZ, Xu H, White BE, Fabricant DS, Liu J, Fong HS, Farnsworth NR, Constantinou AI, Van Breemen RV, Pezutto JM, Bolton JL. Black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.) protects against menadione-induced DNA damage through scavenging of reactive oxygen species: bioassay directed isolation and characterization of active principles. *J Agric Food Chem* 2002, 50: 7022-7028.
4. Cacace JE, Mazza G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *J Food Sci* 2003, 68: 240-248.
- 35 5. Chen H, Fabricant DS, Pauli GF, Fong HHS, Farnsworth NR. Synthesis of Cimicifugoside B, a phenylpropanoid found in *Cimicifuga racemosa*. *Nat Prod Res* 2005, 19: 287-290.
6. Chen H, Zhang ZS, Zhang YL, Zhou DY. Curcumin inhibits cell proliferation by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis in colon carcinoma cells. *Anticancer Res* 1999, 19: 3675-3680.
- 40 7. Chen SN, Fabricant DS, Lua ZZ, Zhang H, Fong HHS, and Farnsworth NR. Cimicifugosides A-D, phenylpropanoid esters from the rhizomes of *Cimicifuga racemosa*. *Photochemistry* 2002, 61: 409-413.
8. Foster S. Black cohosh: *Cimicifuga racemosa*. A literature review. *HerbalGram* 1999, 45: 35-49.
9. He K, Pauli GF, Zheng B, Wang H, Bai N, Peng T, Roller M, Zheng Q. *Cimicifuga* species identification by high performance liquid chromatography-photodiode array/mass spectrometric/evaporative light scattering detection for quality control of black cohosh products. *J Chromatogr A*, 2006, 1112: 241-254.
- 45 10. Huie CW. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal Bioanal Chem* 2002, 373: 23-30.
11. Itokawa H, Aiyama R, Ikuta A. A pungent principle from *Alpinia oxyphylla* *Phytochemistry* 1982, 21: 241-243.
12. Iversen CK. Black currant nectar: Effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid. *J Food Sci* 1999, 64: 37-41.

13. Kennelly KJ, Baggett S, Nuntanakorn P, Ososki AL, Mori SA, Duke J, Coletton M, Kronenberg F. Analysis of thirteen populations of black cohosh for formononetin. *Phytotherapy Research* 2002, 9: 461-467.
14. Kim CD, Lee WK, Lee MH, Cho HS, Lee YK, Roh SS. Inhibition of mast cell-dependent allergy reaction by extract of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*). *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2004, 26: 299-308.
- 5 15. Kim SJ, Kim MS. Inhibitory effects of *Cimicifugae* rhizoma extracts on histamine, bradykinin and COX-2 mediated inflammatory actions. *Phytotherapy Research* 2000, 14: 596-600.
16. Kusano A, Seyama Y, Nagai M, Shibano M, Kusano G. Effects of Fukinolic Acid and Cimicifugic Acids from *Cimicifuga* Species on Collagenolytic Activity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2001, 24: 1198-1201.
- 10 17. Li W, Chen S, Fabricant D, Angerhofer CK, Fong HHS, Farnsworth NR, Fitzloff JF. High-performance liquid chromatographic analysis of Black Cohosh (*Cimicifuga racemosa*) constituents with in-line evaporative light scattering and photodiode array detection. *Analytica Chimica Acta* 2002, 471:61-75.
18. Loncin M, Merson RL. Food engineering: principles and selected applications, Academic Press 1979, New York, USA
- 15 19. Luque-García JL, Luque de Castro MD. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry* 2003, 22: 41-47.
- 20 20. Ohishi K, Aiyama R, Hatano H, Yoshida Y, Wada Y, Yokoi W, Sawada H, Watanabe T, Yokokura T. Structure-Activity Relationships of N-(3,5-Dimethoxy-4-n-octyloxycinnamoyl)-N'-(3,4-dimethylphenyl) piperazine and Analogues as Inhibitors of Acyl-CoA: Cholesterol O-Acyltransferase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2001, 49: 830-839.
21. Pepping JPD. Black cohosh: *Cimicifuga racemosa*. *Journal of Health-System Pharmacy* 1999, 56: 1400-1402.
- 20 22. Roughley PJ, Whiting DA. Experiments in the biosynthesis of curcumin. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions* 1973, 1: 2379 - 2388.
23. Shotipruk A, Kaufman PB, Wang HY. Feasibility study of repeated harvesting of menthol from biologically viable *Mentha x piperata* using ultrasonic extraction. *Biotechnology Progress* 2001, 17: 924-928.
- 25 24. Skrede G, Wrolstad RE, Durst RW. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), *Journal of Food Science* 2000, 65: 357-364.
25. Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* 2001, 8: 303-313.
- 30 26. Yang CLH, Chik, SCC, Li JCB, Cheung BKW, Lau ASY. Identification of the bioactive constituent and its mechanisms of action in mediating the anti-inflammatory effects of Black Cohosh and related *Cimicifuga* species on human primary blood macrophages, submitted to *Journal of Medicinal Chemistry*, jm-2009-006164.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de aislamiento de cimirracemato A de una especie *Cimifuga*, que comprende las etapas de:
- a) proporcionar una cantidad suficiente de materia prima de una especie *Cimicifuga*;
- 5 b) mezclar la materia prima de una especie *Cimifuga* con un disolvente polar acuoso a una temperatura de 20°C a 28°C para obtener un extracto de disolvente que comprende cimirracemato A, en el que el disolvente polar acuoso es agua o agua-etanol que comprende etanol a una concentración de menos del 20%; y
- c) aislar cimirracemato A del extracto de disolvente.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cimirracemato A es aislado del extracto de disolvente usando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el cimirracemato A es eluido usando HPLC del extracto de disolvente a absorbancia UV de 210 nm.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el cimirracemato A es eluido usando HPLC del extracto de disolvente a 23°C.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la materia prima de una especie *Cimicifuga* es molida para dar polvo.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la especie *Cimicifuga* es seleccionada del grupo que consiste en *Cimicifuga racemosa*, *Cimicifuga foetida*, y *Cimicifuga heracleifolia*, en el que, preferiblemente, la especie
- 20 *Cimicifuga* es *Cimicifuga racemosa*.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el disolvente polar acuoso es agua - etanol que comprende etanol a una concentración menor del 20%.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la especie *Cimicifuga* es mezclada con agua - etanol en una relación de 1:15 a 1:20 (p / v).
- 25 9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el disolvente polar acuoso es agua.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la especie *Cimicifuga* es mezclada con agua en una relación de 1:15 - 1:20 (p / v).
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que *Cimicifuga racemosa* es mezclada con agua en una relación de 1:15 (p / v).
- 30 12. El procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en las etapas de:
- a) proporcionar una cantidad suficiente de materia prima de una especie *Cimicifuga*;
- b) mezclar la materia prima de una especie *Cimifuga* con un disolvente polar acuoso a una temperatura de 20°C a 28°C para obtener un extracto de disolvente que comprende cimirracemato A, en el que el disolvente polar acuoso es agua o agua-etanol que comprende etanol a una concentración menor del 20%; y
- 35 c) aislar cimirracemato A del extracto de disolvente.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el disolvente polar acuoso es agua.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la especie *Cimicifuga* es mezclada con agua en una relación de 1:15 - 1:20 (p / v).
- 40 15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende además la formulación del cimirracemato A aislado para dar una composición farmacéutica seleccionada entre comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pastillas, supositorios, soluciones orales, suspensiones, o una composición farmacéutica adaptada para su administración mediante inyección local a seres humanos, preferiblemente una composición
- 45 seleccionada a partir de comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, o pastillas



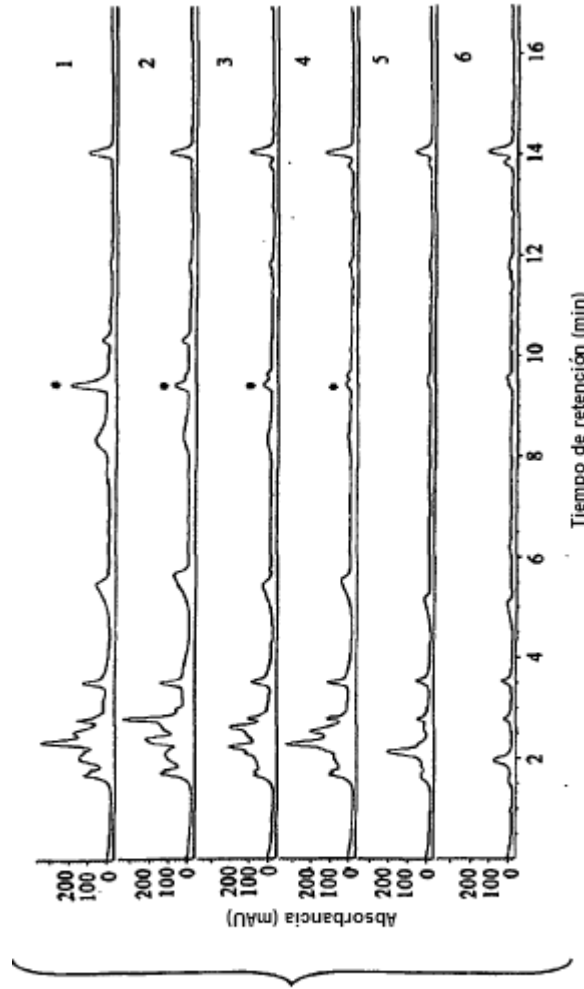


FIG. 2

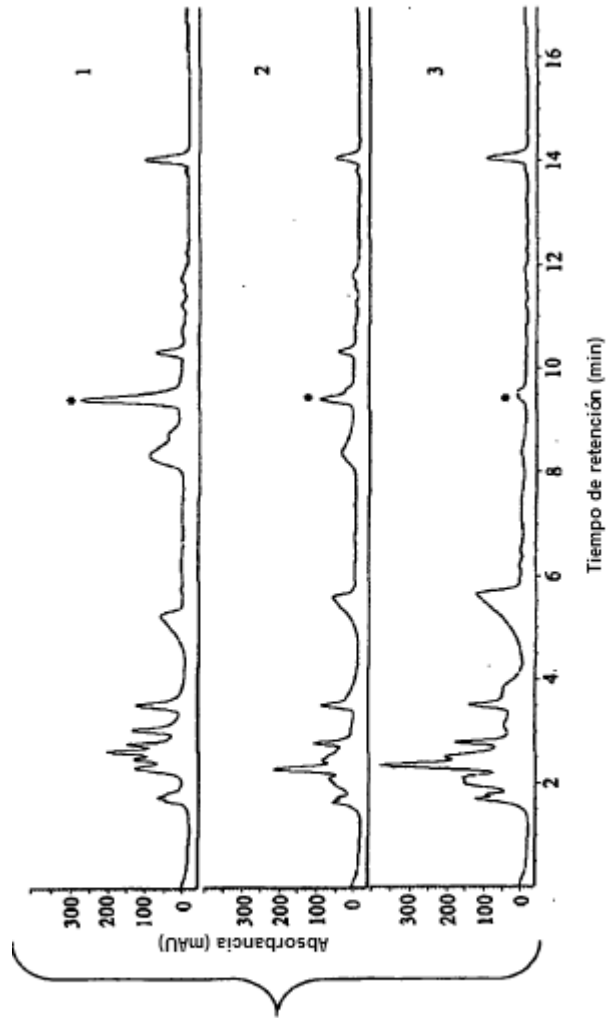


FIG. 3

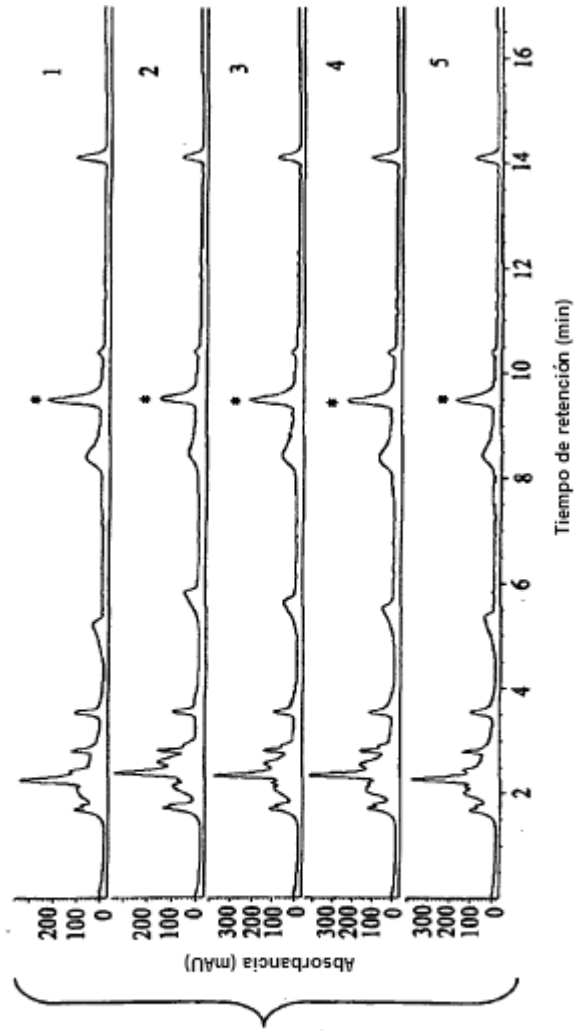


FIG. 4

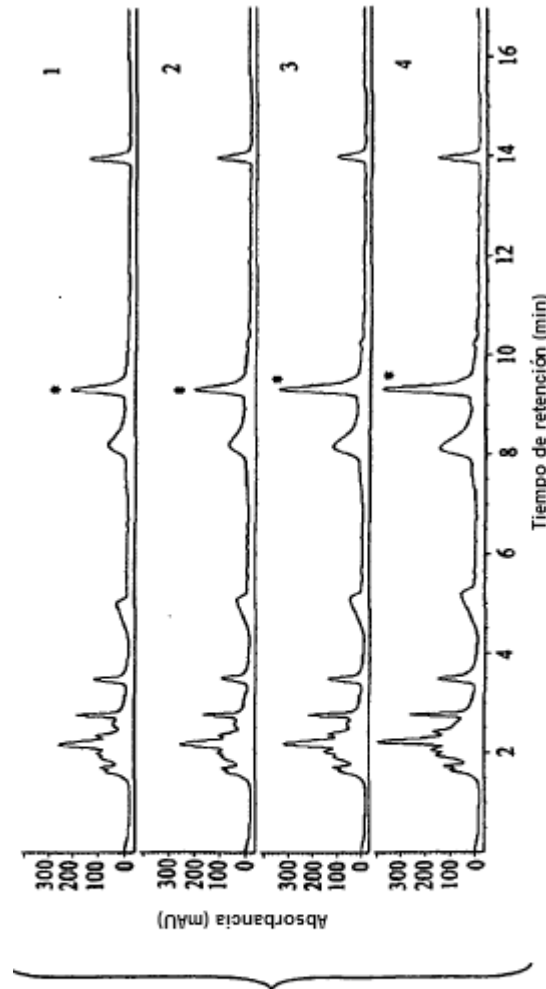


FIG. 5

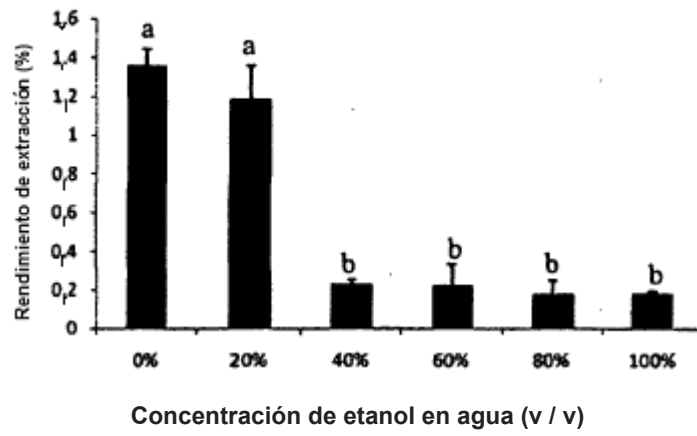


FIG. 6

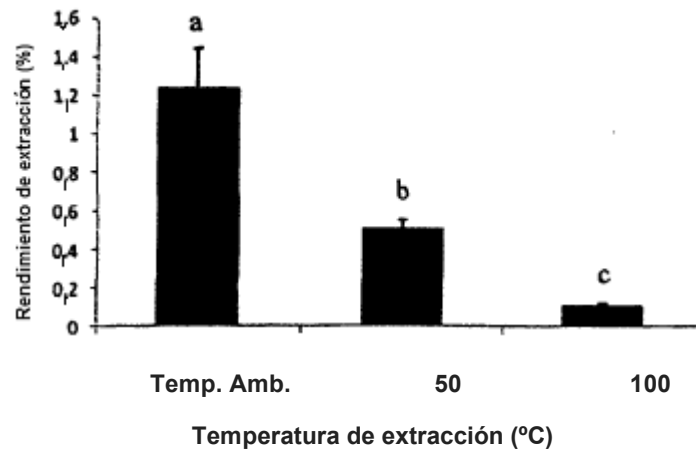


FIG. 7

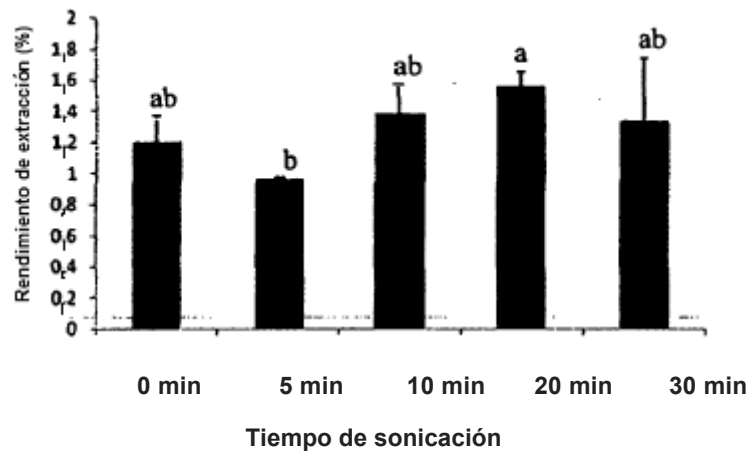


FIG. 8

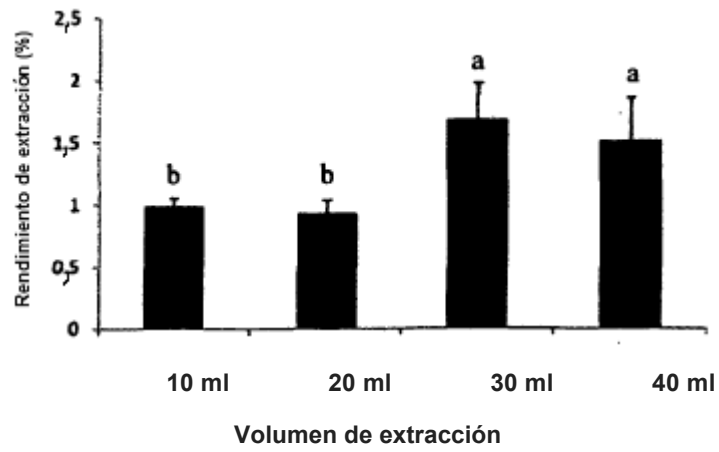


FIG. 9

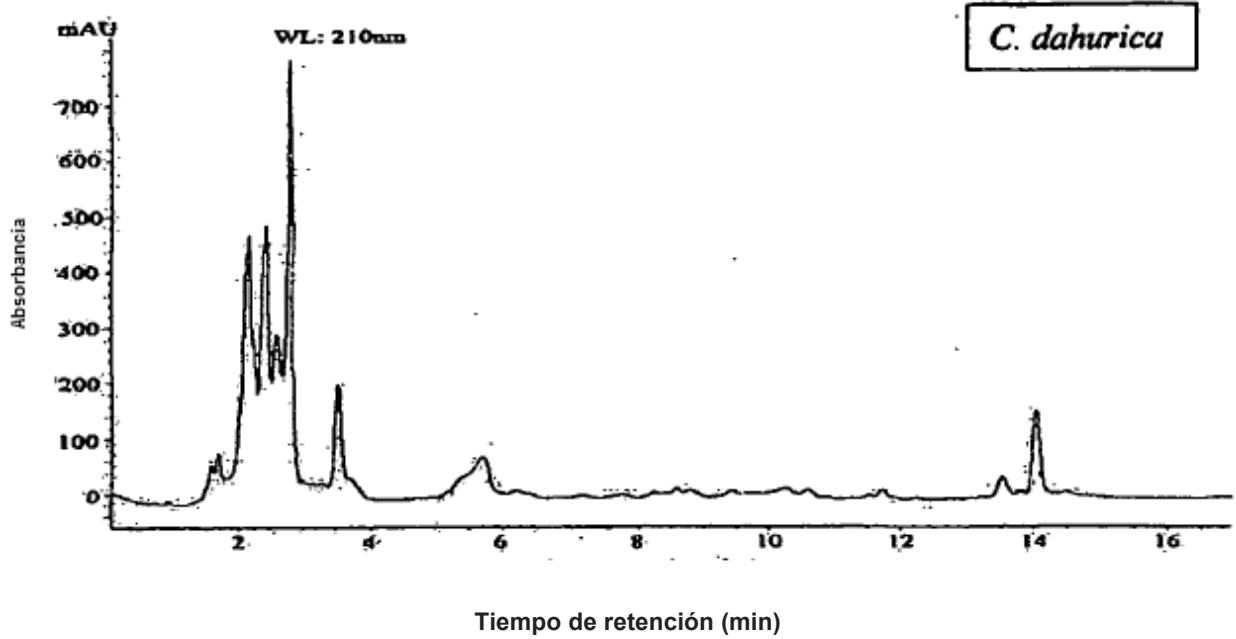


FIG. 10A

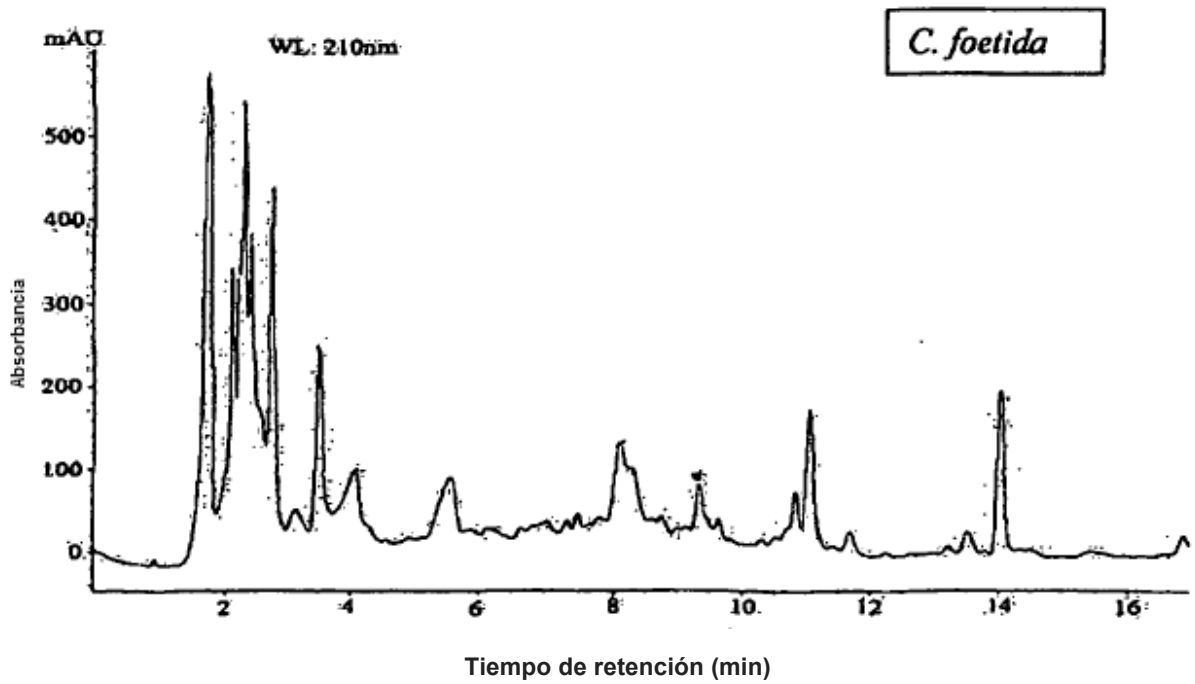


FIG. 10B

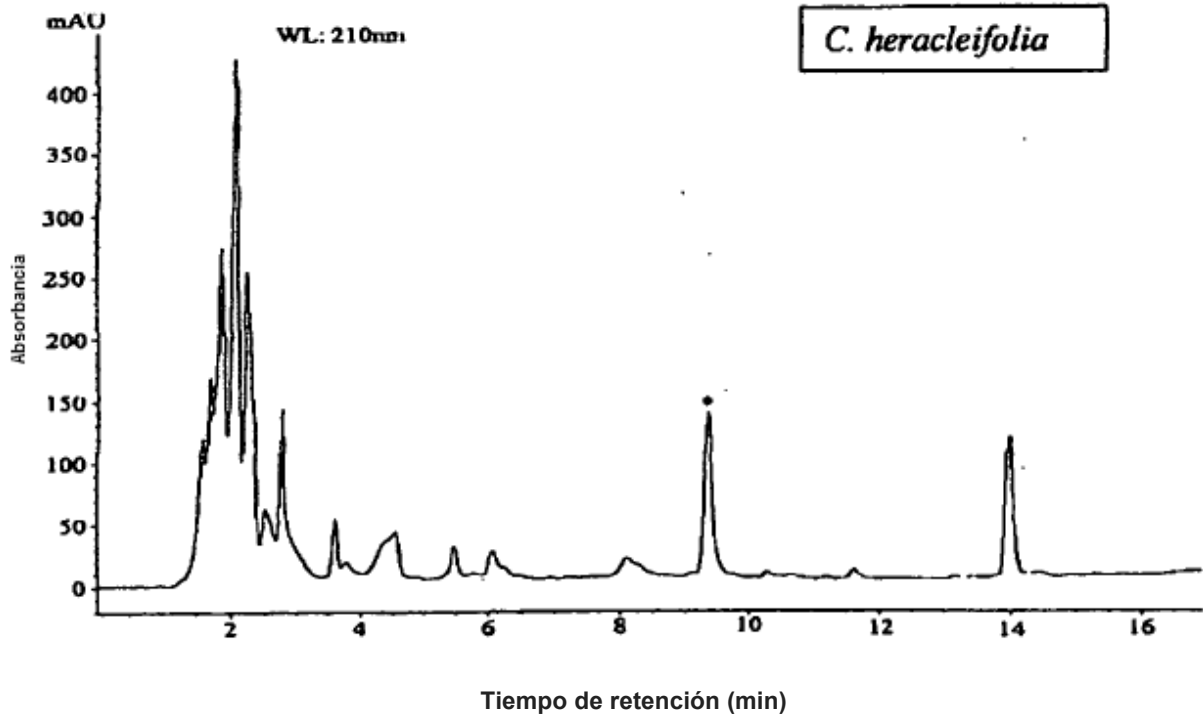


FIG. 10C