

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 864**

51 Int. Cl.:

C07D 309/10 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2009 E 09718537 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2265595**

54 Título: **Nuevos compuestos de flavonol, una fracción/extracto bioactivo de Ulmus wallichiana y sus compuestos para la prevención o tratamiento de trastornos relacionados con la salud de los huesos**

30 Prioridad:

05.03.2008 IN DE05342008

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

29.09.2015

73 Titular/es:

**COUNCIL OF SCIENTIFIC & INDUSTRIAL
RESEARCH (100.0%)
Anusandhan Bhawan, 2, Rafi Marg
New Delhi 110 001, IN**

72 Inventor/es:

**MAURYA, RAKESH;
RAWAT, PREETI;
SHARAN, KUNAL;
SIDDIQUI, JAWED AKHTAR;
SWARNKAR, GAURAV;
MISHRA, GEETANJALI;
MANICKAVASAGAM, LAKSHMI;
ARYA, KAMAL RAM;
CHATTOPADHYAY, NAIBEDYA y
JAIN, GIRISH KUMAR**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 546 864 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

Nuevos compuestos de flavonol, una fracción/extracto bioactivo de *Ulmus Wallichiana* y sus compuestos para la prevención o tratamiento de trastornos relacionados con la salud de los huesos

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de una composición farmacéutica que proporciona nuevos compuestos de flavonol, nuevos extractos vegetales, sus fracciones y compuestos puros aislados de fuentes naturales que son útiles para la prevención y/o tratamiento de diversas indicaciones médicas asociadas a los síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógenos, preferentemente en la prevención o tratamiento de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógenos causadas en seres humanos y animales, y la obtención de masa ósea máxima (PBM) durante el crecimiento y salud del esqueleto en seres humanos y animales. En particular, la presente invención se refiere además a procedimientos para la preparación de extractos biológicamente activos, fracciones y aislamiento de compuestos puros, a partir de la planta *Ulmus wallichiana* de la familia de Ulmáceas, sus sales y composiciones farmacéuticamente aceptables son el aspecto principal de la presente invención.

10

15

Antecedentes de la invención

La osteoporosis, que se ha definido como un “estado de baja masa ósea” es uno de los principales problemas de envejecimiento de la sociedad. La osteoporosis es un trastorno metabólico caracterizado por un deterioro microarquitectónico del tejido óseo que conduce a una mayor fragilidad ósea y un aumento consiguiente del riesgo de fractura en los miembros de edad avanzada de la población. Las fracturas por osteoporosis ocurren de la manera más común en la columna vertebral, cadera, radio distal y costillas. El riesgo es elevado en mujeres en comparación con hombres y aumenta de forma aguda a partir de la edad de 50 años. Los factores de predisposición a la osteoporosis incluyen antecedentes familiares, factores genéticos, factores hormonales, nutrición inapropiada e ingesta de determinados medicamentos, inmovilidad y enfermedades. La calidad de vida se ve seriamente afectada en las personas con osteoporosis grave. Se sabe que afecta a > 50 % de las mujeres y 30 % de los hombres con más de 50 años. En mujeres, existe una tasa acelerada de pérdida ósea de forma inmediata y durante un número variable de años tras la menopausia.

20

25

Existe un nexo bien reconocido entre la prevalencia de la obtención de PBM y osteoporosis entre las mujeres del Sur de Asia (S. Adami, Osteoporosis Int., 1:S27-30, 1994). PBM se define como el nivel más elevado de masa ósea que se puede lograr como resultado de un crecimiento normal. La adolescencia es el período más crítico de la vida para la salud ósea ya que más de la mitad de PBM se acumula durante los años de adolescencia. Durante estos años de edad temprana, la formación ósea es mayor que la resorción ósea y la masa ósea aumenta. PBM obtenida en la edad adulta temprana es un determinante importante de la fragilidad del esqueleto al menos hasta la edad de 70 años (L. A. Soyka, W. P. Farifield, A. Klibanski, J Clin Endocrinol Meta, 11:3951-3963, 2000). Tras la obtención de PBM, la resorción es más rápida que la formación y la masa ósea disminuye. Aunque la pérdida de masa ósea gradual es normal con el envejecimiento, aquellas personas que no logran un PBM óptimo y las que presentan una pérdida de masa ósea acelerada tienen el riesgo más elevado de osteoporosis. Además, un PBM bajo predispone a un mayor riesgo de fractura por fragilidad.

30

35

40

Por tanto, debido a que las personas con elevado PBM a la edad joven son susceptibles de tener una masa ósea elevada en la edad avanzada, los agentes que aumentan PBM durante el desarrollo del esqueleto constituyen un objetivo deseable para la prevención de la osteoporosis. PBM tiene lugar varios años después de completarse el crecimiento lineal ya que la acumulación mineral ósea continúa después de este momento, aunque el tiempo preciso para obtener PBM no resulta concreto y varía entre los distintos puntos del esqueleto. La densidad de masa ósea por área (BMD) en el fémur alcanza un máximo a la edad de 20 años, mientras que la masa total del esqueleto tiene lugar 6-10 años después, bastante después de la interrupción de la acción anabólica de la hormona del crecimiento (GH).

45

La mayoría de los agentes farmacológicos disponibles para los trastornos de pérdida ósea incluyen calcio, vitamina D y sus análogos, calcitonina, bisfosfonatos, raloxifeno, terapia de sustitución hormonal (HRT), etc, que actúa disminuyendo la tasa de resorción ósea, ralentizando de este modo la tasa de pérdida ósea. La administración programada de dichos agentes anti-resorción evita la pérdida ósea.

50

La terapia de sustitución hormonal, aunque eficaz en la prevención de la pérdida ósea tras ovariectomía o menopausia en mujeres se asocia a un riesgo elevado de hiperplasia de endometrio y cáncer [Grady, D. Gebretsadik, T. Ernestwr, V. Petitti, D. Gynecol. 85, 304-313 (1995), Beresford S. A. Weiss, N. S. Voight, L. F. McKnight, B. Lancet 349, 458-461 (1997)], cáncer de mama [Riggs, L. Hartmann, L. C. J. Med. 348, 619-629 (2003)] y enfermedades trombo-embólicas [Delmas, P. D. Lancet 359, 2018-2026 (2002)].

55

El efecto secundario de la terapia de calcio es del desarrollo de cálculos renales. La principal desventaja del uso de calcitonina es su elevado coste. Tras el tratamiento con calcitonina, algunos individuos pueden desarrollar taquifilaxis.

60

Los bisfosfonatos tienen una escasa absorción y pueden provocar irritación gastrointestinal, diarrea y estreñimiento. Se ha informado de que raloxifeno aumenta la incidencia de sofocos, trombosis de venas interiores, embolia pulmonar y calambres en las piernas [Clemett, D.; Spencer, C. M. *Drugs* 60, 380-409 (2000)].

5 El documento CN 101 058 594 A se refiere a un extracto procedente de *Sarcandra glabra* para la prevención de insuficiente hepática.

El documento US 2003/109462 se refiere a derivados de naringenina y el uso de estos derivados como componentes activos en composiciones insecticidas.

10 MARAIS C. ET AL.: "(S)- and (R)-Eriodictiol-6-C- β -D-glucopyranosid, novel keys to the fermentation of rooibos (*Aspalathus linearis*)" *PHYTOCHEMISTRY*, PERGAMON PRESS, GB, vol. 55, n° 1, 1 de septiembre de 2000 (2000-09-01), páginas 43-49, XP004291558 ISSN: 0331-9422 describe la fermentación de rooibos (*Aspalathus linearis*), donde las hojas y tallo procesados de *Aspalathus linearis* contienen un par diastereomérico de las flavonas, (S)- y (R)-eriodictiol-6-C- β -D-glucopiranosido, que también se forma por medio de ciclación oxidativa de la dihidrochalcona, as-palatina, en condiciones que se parecen al procedimiento de fermentación.

15 El documento US 2008/003300 se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad ósea y la prevención de enfermedades óseas, incluyendo pérdida ósea provocada por osteoporosis, restitución ósea de fracturas y osteomalacia, usando un flavonoide de anillo-B y al menos un flavano en una mezcla con un sistema de calcio/fosfato que contiene uno o más iones seleccionados entre el grupo que consiste en iones de magnesio, cinc y fluoruro.

20 WANG, XIN-LUAN ET AL.: "Effects of eleven flavonoids from the osteoprotective fraction of *Drynaria fortunei* (Kunze) J. SM. on osteoblastic proliferation using an osteoblast-like cell-line" *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 56(1), 46-51 CODEN; ISSN: 009-2363, 2008, XP002531858 se refiere a *Drynaria fortunei* (KUNZE) J. SM. (DFE), una de las medicinas chinas tradicionales usadas con mayor frecuencia prescrita para el tratamiento de osteoporosis en China. Se diseñó un estudio para investigar los constituyentes osteoprotectores de *Drynaria fortunei*. Once flavonoides procedentes de rizomas de *D. fortunei* mostraron actividad sobre la proliferación de células UMR106.

25 El documento EP-A-1 514 540 se refiere a agentes para el fortalecimiento de tejidos que contienen calcio, en el que los agentes pueden escogerse entre, por ejemplo, flavonas, flavonoles y flavanonas.

30 Los factores relativos a la obtención de PBM incluyen factores congénitos, dieta, hormonales, actividad física, estilo de vida, fármacos y enfermedades. Una intervención terapéutica destinada a aumentar PBM se ha limitado únicamente al control de los factores tales como estado de estrógenos, ingesta de calcio en la dieta y actividad física. Parece que la ingesta de calcio es relevante hasta la denominada ingesta umbral (1000 mg/día), aunque no parece que asignaciones superiores ofrecen ventajas adicionales. El ejercicio afecta únicamente a las regiones del esqueleto bajo tensión mecánica. La administración de estrógenos es realista únicamente en condiciones caracterizadas por hipostrogenismo grave. Claramente, la deficiencia nutricional es uno de los motivos principales para la ausencia de PBM entre la población asiática del sur, en particular entre las mujeres que presentan mayor tendencia a la pérdida ósea en las etapas avanzadas de la vida. Por tanto, los agentes que favorecen PBM tienen una implicación terapéutica para los trastornos de pérdida ósea.

A la vista del uso de estas terapias y sus efectos secundarios asociados indican la necesidad de opciones alternativas en la prevención y tratamiento de osteoporosis y el fallo a la hora de lograr PBM.

40 La medicina tradicional es una práctica médica antigua que existió en las sociedades humanas antes de la aplicación de la ciencia moderna a la salud. La importancia de la medicina tradicional como fuente cuidados de salud primarios se reconoce por primera vez de forma oficial por la Organización Mundial de la Salud (WHO) en 1976, por medio del establecimiento global del Programa de Medicina Tradicional. En la medicina tradicional, existen muchos fármacos puros naturales que tienen el potencial de tratar enfermedades óseas. No obstante, no se ha presentado mucho trabajo de laboratorio en cuanto a la evaluación de su posible desarrollo y uso, exceptuando ipriflavona, un derivado de producto natural, que se ha usado clínicamente para dichas indicaciones [Fujita, T.; Yoshikawa, S.; Ono, K.; Inoue, T.; Orimo, H. *J. Clin. Exp. Med.* 138, 113-141 (1986), Passeri, M; Biondi, M.; Costi, D.; Bufalino, L.; Castiglione, G. N.; DiPeppe, C.; Abate, G. *Bone Miner.* 19 (Suplemento 1), S57-62 (1992)]. Se piensa que las medicinas de hierbas se encuentran fácilmente disponibles, son menos costosas y más seguras que los fármacos sintetizados por vía química. En la India, la medicina Ayurvédica surgió durante la proliferación de las filosofías Upanishad, Budismo y otras escuelas de pensamiento de la India. Las hierbas jugaron un papel importante en la medicina Ayurvédica. Una medicina de hierbas Ayurvédica es Planchón de *Ulmus wallichiana*. En el ámbito de los sanadores tradicionales Kumaon, se usa esta planta para promover la curación de fracturas [Gaur, R. D. *Flora of District Garhwal, Noroeste del Himalaya*. Trans Media, Srinagar (Garhwal), India, 1999, pp. 86; Arya, K. R.; Agarwal, S. C. *Indian J. Traditional Knowledge*, impresión en curso], pero los efectos sobre osteoporosis y los trastornos relacionados con la salud de los huesos no se han investigado desde el punto de vista científico.

55 Por tanto, existe una urgente necesidad de descubrir y desarrollar un producto herbáceo prometedor o un fármaco basado en una molécula biológicamente activa individual o un cóctel de moléculas biológicamente activas y puras, procedente de plantas, que exhiban actividad de formación ósea o anabólica ósea en animales experimentales y

seres humanos. La *Ulmus wallichiana* fue un caso para estudiar y explorar su potencial real con respecto a la respuesta de formación ósea de su extracto, fracción y componentes marcadores biológicamente activos puros. Los experimentos han demostrado que su extracto puro, fracción soluble en acetona y compuestos puros aislados a partir del extracto y la fracción exhiben una actividad de formación ósea prometedora.

- 5 El Planchón de *Ulmus wallichiana*, que pertenece a la familia de Ulmáceas, distribuida por todo el Himalaya desde Afganistán hasta W. Nepal [Dictionary of Indian Folk Medicine and Ethnobotany editado por Jain, S. K., Deep Publications, Paschim Vihar, Nueva Deli, India, 1991, pp 183]. Las hojas de la planta dan lugar a una fibra fuerte para campos de corteza y forraje. En la India esta planta se encuentra en Kumaon e Himalaya Garhwal, localmente denominado Chamarmou, un árbol de hoja caduca que crece hasta los 35 m de altura. De momento, no se ha
10 investigado esta planta desde el punto de vista químico y farmacológico.

Objetivo de la invención

El objetivo principal de la presente invención es preparar nuevos compuestos, una fracción/extracto bioactivo de *Ulmus wallichiana* útil para el tratamiento o prevención de trastornos óseos.

- 15 Otro objetivo de la presente invención consiste en identificar los compuestos marcadores de la fracción/extracto bioactivo.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar el procedimiento de aislamiento de los componentes individuales.

- 20 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar la composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógenos, provocadas en seres humanos y animales y lograr una masa ósea máxima (PBM) durante el crecimiento y salud del esqueleto en seres humanos y animales.

Sumario de la invención

- 25 La presente invención se refiere al campo de una composición farmacéutica que proporciona nuevos compuestos de flavonol, nuevos extractos vegetales, sus fracciones y compuestos puros aislados a partir de fuentes naturales que son útiles para la prevención y/o tratamiento de diversas afecciones medicas asociadas a síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógenos, preferentemente en la prevención o tratamiento de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógenos provocados en seres humanos y animales, y lograr una masa ósea máxima (PBM) durante el crecimiento y salud del esqueleto en seres humanos y animales. En particular, la presente invención se refiere además a los procedimientos para la
30 preparación de extractos biológicamente activos, fracciones y aislamiento de compuestos puros, a partir de una planta de *Ulmus wallichiana* de la familia de Ulmáceas, sus sales y composiciones farmacéuticamente aceptables del aspecto principal de la presente invención.

Breve descripción de los diagramas asociados a la invención

- 35 **Figura 1:** Diagrama de flujo que muestra la extracción, fraccionamiento y aislamiento del extracto puro y fracciones puras de corteza del tallo de *Ulmus wallichiana*.

- 40 **Figura 2:** El extracto etanólico de *Ulmus wallichiana* reduce la pérdida ósea inducida por Ovx en ratas. Se midió BMD (Densidad de Masa Ósea) por medio de DEXA en huesos extirpados. Las ratas Ovx se trataron con 750 mg/kg de peso corporal. Se compararon C002 durante 90 días con ratas de operación simulada y Ovx tratadas con vehículo (control). (A) Fémur global, (B) cuello de fémur, (C) eje del fémur y (D) cuarta vértebra lumbar (**-P < 0,001, *-P < 0,01, *-P<0,05 cuando se comparan con BMD de simulación. a- P< 0,001, b-P< 0,01, c- P< 0,05 cuando se compara con el BMD de control ovx).

- 45 **Figura 3:** El extracto etanólico de *Ulmus wallichiana* no es estrogénico en ratas a nivel uterino. Peso uterino de 750 mg/kg de peso corporal. Se compararon ratas tratados con C002 durante 90 días con ratas de simulación de control y ratas ovx. ***-P < 0,001, **-P < 0,01, *-P<0,05 cuando se comparan con peso uterino de ratas de control simulación; c- P< 0,001, b-P< 0,01, a- P< 0,05 cuando se compara con el peso uterino de ratas ovx.

- 50 **Figura 4:** El extracto etanólico y una fracción de *Ulmus wallichiana* favorece PMB en ratas inmaduras. Se midió BMD por medio de DEXA en huesos extirpados. (A) se comparó fémur de ratas hembra en crecimiento tratadas con 750 mg/kg de C002 y 50 mg/kg de 914/F006 (una fracción de 914/C002) con ratas tratadas con vehículo (control). (B) Se comparó cuarta vértebra lumbar de control y ratas tratadas con 750 mg/kg de 914/C002 (**-P< 0,001, **-P< 0,01, *-P< 0,05).

Figura 5: El extracto etanólico de *Ulmus wallichiana* favorece las células osteoprogenitoras en ratas inmaduras. Se compararon valores de BMC (Células de Médula Ósea) de ratas hembra en crecimiento tratadas con 750 mg/kg de 914/C002 con ratas tratadas con vehículo (control). (A) Ensayo de fosfatasa alcalina (para diferenciación de osteoblastos), B) microfotografías de células teñidas con rojo-S de alizarina (para

mineralización de osteoblastos) y (C) cuantificación de tinción de rojo-S de alizarina tras extracción (**-P< 0,001, *-P< 0,01, *-P< 0,05).

Figura 6: Cuatro extractos puros de *Ulmus wallichiana* favorecen la diferenciación de osteoblastos de la bóveda craneal in vitro. Se trataron los osteoblastos de la bóveda craneal con K012, K058, K068 y K100 a concentraciones de 1 y 100 nM y se cuantificó la producción de ALP (fosfatasa alcalina). ***-P<0,001, **-P<0,01, *-P< 0,05; N= 3.

Figura 7: Cuatro extractos puros de *Ulmus wallichiana* favorecen la mineralización in vitro de osteoblastos de la bóveda craneal. Se trataron los osteoblastos de la bóveda craneal con K012, K058, K068 y K100 a concentraciones de 1 y 100 nM. (A) Microfotografía de osteoblastos teñidos con rojo-S de alizarina. (B) Cuantificación de tinción de rojo-S de alizarina tras su extracción (**-P< 0,001, **-P<0,01, *-P<0,05). (C) Microfotografía de osteoblastos teñidos por medio del método de von kossa.

Figura 8: K058 favorece la proliferación de osteoblastos de la bóveda craneal. Se trataron los osteoblastos de la bóveda craneal con K058 a concentraciones de 1 y 100 nM y se llevó a cabo el ensayo de proliferación de células BrdU. ***-P< 0,001, **-P<0,01, *-P<0,05; N = 3.

Figura 9: Cuatro compuestos puros de *Ulmus wallichiana* favorecen la mineralización in vitro de BMC (células de médula ósea). Se trataron BMC con K012, K058, K068 y K100 a concentraciones de 1 y 100 nM y se llevó a cabo la mineralización. (A) Microfotografías de células teñidas con rojo-S de alizarina. (B) Cuantificación de tinción de rojo-S de alizarina tras su extracción (**-P<0,001, **-P<0,01, *-P<0,05).

Figura 10: K068 y K100 inhiben la diferenciación adipogénica de preadipocitos murinos 3T3-L1. (A) Se trataron células 3T3-L1 con K068 y K100 a concentraciones de 1 μ M, 100 nM y 1 nM y se llevó a cabo la tinción de rojo-S de aceite. Se sometió a extracción la tinción y se cuantificó. ***-P<0,001, **-P<0,01, *-P<0,05; N = 3. (B) PCR RT semi-cuantitativa de diversos genes específicos de diferenciación de adipocitos tras el tratamiento de células de pre-adipocito 3T3-L1 con 100 nM y 1nM de K068 y K100 durante 8 días (tiempo de diferenciación de adipocitos). Se usó GAPDH como control de carga de ARN. Dibujo de gel representativo de los tres experimentos independientes con resultados similares.

Figura 11: K058 aumenta los niveles de ARNm de diversos genes específicos de osteoblasto. PCR RT semi-cuantitativa de diversos ARNm de osteoblasto tras el tratamiento de osteoblastos de bóveda craneal con 100 nM de K058 en diversos instantes de tiempo. Se usó GAPDH como control de carga interno. Dibujo de gel representativo de los tres experimentos independientes con resultados similares.

Figura 12: K058 y K012 no poseen carácter estrógeno y anti-estrogénico in vitro. Las células de Ishikawa tratadas con 17β -estradiol estimulan la producción de ALP. (A) Aumento considerable de ALP (fosfatasa alcalina) con 10^{-8} M de 17β -estradiol en comparación con el control. K058, K012 y raloxifeno a diversas concentraciones no presentan respuesta alguna. (B) Niveles de ALP con diversas concentraciones de K012, K058 y raloxifeno en presencia de 17β -estradiol 10^{-8} M.

Figura 13: K058 reduce la pérdida ósea inducida por Ovx en ratas. Se midió BMD por medio de DEXA en huesos extirpados. Se compararon ratas Ovx tratadas con 1,0&5,0 mg /kg de K058 durante 90 días con ratas de operación simulada y Ovx tratadas con vehículo (control). (A) Fémur global, (B) cuello de fémur, (C) eje del fémur, (D) cuarta vértebra lumbar y (E) cabeza tibial (**-P<0,001, **-P<0,01, *-P<0,05 cuando se compara con BMD de simulación. a-P<0,001, b- P<0,01, c- P<0,05 cuando se compara con BMD de control de Ovx).

Figura 14: K058 no es estrogénico en ratas a nivel uterino. Se comparó el peso uterino de ratas tratadas con 1,0&5,0 mg/kg de peso corporal de K058 durante 90 días con el peso uterino de ratas ovx y simulación de control. ***-P<0,001, **-P<0,01, *-P<0,05 cuando se compara con el peso uterino de ratas de control de simulación, c- P<0,001, b- P<0,01, a- P<0,05 cuando se compara con el peso uterino de ratas ovx.

Figura 15: K058 favorece PBM en ratas inmaduras. Se midió BMD por medio de DEXA en huesos extirpados. Se compararon ratas hembra en crecimiento con 5 mg/kg de K058 con ratas tratadas con el vehículo (control). Se muestra BMD en eje de fémur (**-P<0,001, **-P<0,01, *-P<0,05).

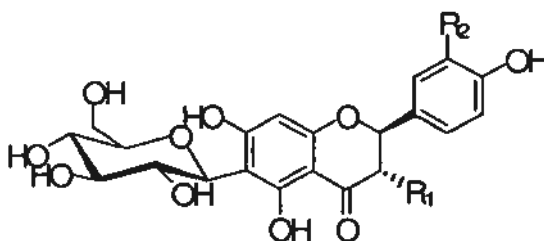
Figura 16: K058 favorece las células osteoprogenitoras en ratas inmaduras. Se compararon BMC de ratas hembra en crecimiento tratadas con 5 mg/kg de K058 durante 30 días con ratas tratadas con el vehículo (control). (A) Ensayo de fosfatasa alcalina, (B) Microfotografías de células teñidas con rojo-S de alizarina y (C) cuantificación de la tinción de rojo-S de alizarina tras la extracción (**-P<0,001, **-P<0,01, *-P<0,05).

Figura 17: K012 reduce la pérdida ósea inducida por Ovx en ratas. Se midió BMD por medio de DEXA en huesos extirpados. Se compararon ratas Ovx tratadas con 1,0&5,0 mg/kg de K012 durante 90 días con ratas con operación simulada y Ovx tratadas con el vehículo (control). (A) cuello de fémur, (B) tibia global, (C) cabeza tibial, (D) punto de separación tibio-fibular, (E) vértebra lumbar global y (F) segunda vértebra lumbar (**-P<0,001, *-P<0,01, *-P<0,05 cuando se compara con BMD de simulación. a- P<0,001, b- P<0,01, c- P<0,05 cuando se compara con BMD de control ovx).

Figura 18: K012 no es estrogénico en ratas a nivel uterino. Se comparó el peso uterino de ratas tratadas con 1,0&5,0 mg/kg de peso corporal de K012 durante 90 días con el peso uterino de ratas simulación de control y ovx. (**-P<0,001, *-P<0,01, *-P<0,05 cuando se compara con el peso uterino de ratas de control de simulación, c- P<0,001, b- P<0,01 y a- P<0,05 cuando se compara con el peso uterino de ratas de ovx).

5 Descripción detallada de la invención

Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto de flavonol de fórmula general 1 en la que R1 y R2 están seleccionados entre el grupo que consiste en H, OH.



K058: R₁=R₂=OH

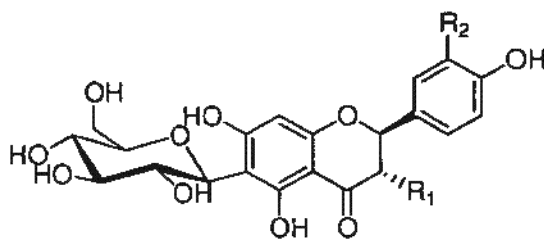
K100: R₁=OH, R₂=H

10 En una realización de la presente invención los compuestos de fórmula general I se aíslan a partir de *Ulmus wallichiana*.

En otra realización de la presente invención, los compuestos son útiles para el tratamiento de trastornos óseos.

Por consiguiente, la presente invención, proporciona un extracto/fracción bioactiva de *Ulmus wallichiana* útil para el tratamiento o prevención de trastornos óseos en el que dicho extracto/fracción comprende compuestos de fórmula general 2,

15



K058: R₁=R₂=OH

K012: R₁=R₂=OH, 2,3-doble enlace

K068: R₁=R₂=H

K100: R₁=OH, R₂=H

Fórmula General 2

En la que los compuestos marcadores K012, K058, K068, K100 varían de 6,7-12 %, 1,5-4,5 %, 0,6-1,2 %, 1,7-4,5 %, respectivamente.

20 En una realización de la presente invención, el extracto se puede obtener a partir de la extracción alcohólica de *Ulmus wallichiana* que comprende los compuestos marcadores K012 (6,7-9 %), K058 (3,3-4,5 %), K068 (0,6-0,7 %), K100 (1,7-2,6 %).

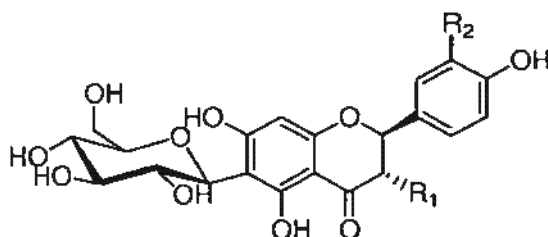
En otra realización de la presente invención, la fracción soluble en acetona se obtiene a partir del extracto alcohólico que comprende los compuestos marcadores K012 (7,9-12 %), K058 (1,7-3,0 %), K068 (0,7-1,2 %) y K100 (2,5-4,5 %).

En otra realización de la presente invención, la fracción soluble en acetona/fracción alcohólica tiene acción de conservación ósea en condiciones de deficiencia de estrógenos.

- 5 En otra realización de la presente invención, la fracción alcohólica mejora la obtención de PBM por medio del aumento de las células osteoprogenitoras en médula ósea. En una realización de la presente invención, la fracción/extracto bioactivo se puede obtener a partir de las partes de plantas seleccionadas entre corteza del tallo, ramitas de *Ulmus wallichiana*.

La fracción/extracto bioactivo obtenido a partir de *Ulmus wallichiana* o sus compuestos marcadores de fórmula general 1, individualmente o en una de sus combinaciones, se usan en el tratamiento o prevención de trastornos óseos.

- 10 La dosis eficaz del extracto alcohólico puede variar entre 500-750 mg/kg y la fracción soluble en acetona varía entre 25 mg/kg y 100 mg/kg.



K058: R₁=R₂=OH

K012: R₁=R₂=OH, 2,3 doble enlace

K068: R₁=R₂=H

K100: R₁=OH, R₂=H

Fórmula General 2

Las sales farmacéuticamente aceptables de la fórmula general 2 pueden comprender sales de sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, oxalato, fumarato, succinato y tartrato.

- 15 Los compuestos de fórmula 2, K012, K058, K068 y K100 exhibieron de 70 a 100 % de aumento de actividad ALP en comparación con el control (vehículo) (Figura 6) en osteoblastos de bóveda craneal tratados a una concentración que varía entre 0,1 nM y 1,0 μM.

- 20 Se comprobó que los compuestos de fórmula 2 aumentaban la deposición de calcio naciente en una cantidad de 10 a 25 % en osteoblastos tratados con K012, K058, K068 y K100, en comparación con el control (vehículo) (Figura 7A & B).

Los compuestos de fórmula 1 mejoran la mineralización de BMC, lo cual se requiere para su acción osteogénica en el crecimiento y mantenimiento del esqueleto.

Se pueden usar los compuestos de fórmula 1 en combinación en proporciones que varían entre 0,25-1,0 (K068): 1,0-5,0 (K100):2,5-7,5 (K058): 5,0-12,5 (K012).

- 25 Los compuestos de fórmula 2, K012, K058 favorecieron la proliferación, diferenciación y mineralización de osteoblastos.

Los compuestos de fórmula 2, K068 y K100 favorecieron la diferenciación y mineralización de osteoblastos y tienen actividad anti-adipogénica en la estirpe celular 3T3 L1.

- 30 El compuesto de fórmula 1 K058, ejerce acción osteogénica por medio del aumento de la síntesis de diversos genes que favorecen las funciones de osteoblastos e inhiben la función de osteoclastos.

El compuesto de fórmula 1, K058 estimuló la incorporación de BrdU (una medida de la proliferación celular) de cultivos semi-confluentes de osteoblastos de bóveda craneal en un cantidad de 25 a 75 % a una concentración que varía entre 10 nM y 1,0 μM (Figura 8).

- 35 El compuesto de fórmula 1, K058 ejerce acción osteogénica por medio del aumento de la síntesis de diversos genes que favorecen las funciones de osteoblastos e inhiben la función de osteoclastos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de fracción/extracto bioactivo procedente de *Ulmus wallichiana* o sus compuestos marcadores de fórmula general 2, individualmente o en una de sus combinaciones, opcionalmente junto con uno o más aditivos, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

En una realización de la invención, la composición comprende: un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en K012, K058, K068 y K100 representado por la fórmula general 2, individualmente o forma de una de sus combinaciones, opcionalmente junto con uno o más aditivos, vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables.

5 En otra realización de la invención, los diluyentes usados pueden estar seleccionados entre el grupo que consiste en almidón, lactosa, fosfato de dicalcio.

En una realización de la invención, el aditivo farmacéuticamente aceptable en forma de un lubricante puede estar seleccionado entre el grupo que comprende talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o esteorotos, polietilen glicoles sólidos, lauril sulfato de sodio o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo o en una combinación apropiada.

10 En otra realización de la invención, la dosificación de dicha composición se administra a una dosis unitaria de al menos 500-700 mg/kg de peso corporal para el extracto alcohólico y 25-100 mg/kg de peso corporal para la fracción soluble en acetona.

15 En una realización de la invención, el extracto alcohólico (C002) procede de *Ulmus wallichiana* que tiene una acción de conservación ósea en condiciones de deficiencia de estrógenos, no tiene acción antagonista de estrógenos a nivel uterino, mejorando la obtención de PBM por medio de las células osteoprogenitoras en la médula ósea en ratas hembra en desarrollo.

Un método de tratamiento de trastornos óseos en un sujeto, en el que dicho método comprende la etapa de administrar una composición farmacéutica al sujeto que lo precisa.

20 En otra realización de la invención, se puede administrar la composición por ruta oral, intravenosa, sub-cutánea, intra-peritoneal o intramuscular.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de la fracción/extracto y los compuestos de *Ulmus wallichiana*, en el que el procedimiento comprende:

- (a) obtener la planta *Ulmus wallichiana*,
- (b) pulverizar el material de la planta,
- 25 (c) extraer el material vegetal en forma de polvo con disolvente prótico a temperatura ambiente,
- (d) filtrar el extracto,
- (e) concentrar el extracto a presión reducida,
- (f) triturar el extracto con hexano para retirar los constituyentes no polares,
- (g) secar el residuo a vacío para obtener un polvo que fluye libremente para proporcionar el extracto deseado,
- 30 (h) disolver el extracto obtenido en la etapa (g) en agua,
- (i) precipitar el extracto acuoso por medio de adición de n-butanol,
- (j) filtrar el precipitado blanco para obtener K058,
- (k) cristalizar el compuesto con la mezcla de metanol y acetato de etilo,
- (l) filtrar el compuesto,
- 35 (m) secar el compuesto para obtener K058 en forma de polvo blanco que fluye libremente,
- (n) concentrar el filtrado y trituración con acetona,
- (o) aislar los compuestos K012, K068, K100 a partir de la fracción soluble en acetona por medio de métodos cromatográficos convencionales,
- (p) cuantificación de K058, K012, K068 y K100 en el extracto y en la fracción soluble en acetona.

40 En una realización de la invención, el alcohol usado para la extracción está seleccionado entre el grupo que consiste en metanol, etanol, propanol o sus combinaciones apropiadas.

En otra realización de la invención, los disolventes usados para la trituración pueden estar seleccionados entre un grupo que consiste en acetona, etil metil cetona, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, metanol o una de sus combinaciones apropiadas.

45 La presente invención proporciona un procedimiento para la extracción, fraccionamiento y aislamiento de compuestos puros a partir de una fuente natural para la prevención o tratamiento de los síntomas de diversas indicaciones médicas asociadas a síndromes o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno, provocadas en seres humanos y/o animales.

50 El procedimiento de preparación del extracto de *Ulmus wallichiana* implica la extracción del material de la planta con alcohol, retirando los constituyentes grasos no polares por medio de trituración con hexano.

El extracto obtenido de este modo es útil para su uso como producto nutricional, complemento de la dieta o composición farmacéutica, y se puede preparar en cualquier forma de dosificación apropiada para administración oral.

5 El procedimiento para el aislamiento del principio activo del extracto de *Ulmus wallichiana* implican disolver el extracto en agua y precipitar el compuesto por medio de n-butanol. Alternativamente, el compuesto obtenido del procedimiento puede proceder de una disolución de base acuosa. El compuesto activo obtenido de este modo es útil para su uso como producto nutricional, complemento de la dieta o composición farmacéutica, y se puede preparar en cualquier forma de dosificación apropiada para administración oral.

Los métodos para evitar o tratar trastornos o estados de enfermedad mencionados en la presente memoria comprenden administrar a un ser humano individual o cualquier otro mamífero o cualquier otro animal que requiere dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes de la presente invención.

10 El régimen de dosificación y el modo de administración de los agentes de la presente invención o una de sus sales farmacéuticamente aceptable o composición farmacéuticamente aceptable, con uno o más vehículos, excipientes, etc., farmacéuticamente aceptables. variará de acuerdo con el tipo de trastorno o estados de enfermedad descritos en la presente memoria y será objeto de valoración por parte del médico implicado.

15 El agente de la presente invención o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o composiciones farmacéuticamente aceptables con uno o más de los vehículos, excipientes, etc., farmacéuticamente aceptables puede administrarse de forma eficaz en dosis que varían de 0,1 mg a 5000 mg, más preferentemente en dosis que varían de 0,5 a 1000 o todavía más preferentemente en dosis que varían de 1 mg a 500 mg, semanal o mensualmente, o diariamente o dos o tres veces al día, o en dosis aún más divididas.

20 Dichas dosis se pueden administrar por medio de cualquier ruta apropiada por ejemplo, administración oral, sistémica, local o tópica, por ejemplo, intravenosa, intra-arterial, intra-muscular, subcutánea, intra-peritoneal, intra-dérmica, bucal, nasal, inhalación, vaginal, rectal, transdérmica o cualquier otro medio en cualquier forma de dosificación líquida o sólida convencional para lograr, una administración convencional, administración controlada o administración dirigida de los compuestos de la presente invención o una de sus sales farmacéuticamente aceptable o una composición farmacéuticamente aceptable, con uno o más vehículos, excipientes, etc., farmacéuticamente aceptables.

25 Un modo preferido de administración de agentes de la presente invención o una de sus sales farmacéuticamente aceptable o composición farmacéuticamente aceptable es oral. Generalmente, las composiciones orales comprenden los agentes de la presente invención o una de sus composiciones farmacéuticamente aceptables y uno o más de los excipientes farmacéuticamente aceptables.

30 Las composiciones orales tales como comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos y similares pueden contener cualesquiera excipientes farmacéuticamente aceptables:

1. un diluyente tal como lactosa, manitol, sorbitol, celulosa microcristalina, sacarosa, citrato de sodio, fosfato de dicalcio, o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo o en una de sus combinaciones apropiadas;
2. un aglutinante tal como goma de tragacanto, goma arábiga, metil celulosa, gelatina, polivinil pirrolidona, almidón o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo o en una de sus combinaciones apropiadas;
- 35 3. un agente desintegrante tal como agar-agar, carbonato de calcio, carbonato de sodio, silicatos, ácido algínico, almidón de maíz, almidón de tapioca de patata, primogel o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo o en cualquier combinación apropiada;
4. un lubricante tal como estearato de magnesio, estearato de calcio o esteorotos, talco, polietilen glicoles, lauril sulfato de sodio o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo o en cualquiera de sus combinaciones apropiadas;
- 40 5. una sustancia de deslizamiento tal como dióxido de silicio coloidal o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo o en cualquiera de sus combinaciones apropiadas;
6. un agente edulcorante tal como sacarosa, sacarina o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar o en una de sus combinaciones apropiadas;
- 45 7. un agente aromatizante tal como menta piperita, salicilato de metilo, aroma de naranja, aroma de vainilla o cualquier otro aroma farmacéuticamente aceptable solo o en cualquiera de sus combinaciones apropiadas;
8. agentes humectantes tales como alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo o cualquier otro aroma farmacéuticamente aceptable solo o en cualquiera de sus combinaciones aceptables;
- 50 9. absorbentes tales como caolín, arcilla bentonita o cualquier otro aroma farmacéuticamente aceptable solo en cualquiera de sus combinaciones apropiadas;
10. agentes de retardo de la disolución tales como cera, parafina o cualquier otro aroma farmacéuticamente aceptable solo o en cualquiera de sus combinaciones apropiadas.

55 Por tanto, la presente invención pretende solucionar los problemas anteriores asociados a la cura y tratamiento asociados a síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno, preferentemente en la prevención o tratamiento de enfermedades dependientes o independientes de estrógenos en seres humanos y animales y más particularmente los síndromes y trastornos de salud ósea. La presente invención también pretende favorecer la obtención de masa ósea máxima durante el crecimiento del esqueleto a medida que tiene lugar en la adolescencia. El extracto puro y la fracción soluble en acetona y los compuestos puros K012, K058, K068 y K100 de *Ulmus wallichiana* descritos en la presente invención son útiles en el tratamiento, prevención, tratamiento y cura de

60

síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno, preferentemente en la prevención o tratamiento de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógenos provocados en seres humanos y animales, y la obtención de PBM durante el crecimiento y salud del esqueleto en seres humanos y animales.

5 Uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar un extracto puro procedente de *Ulmus wallichiana* en forma farmacéuticamente aceptable con el fin de mejorar su aplicación potencial para el tratamiento o prevención o
10 tratamiento o cura de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno, preferentemente en la prevención o tratamiento de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno provocados en seres humanos y animales, y la obtención de PBM durante el crecimiento y salud del esqueleto en seres humanos y animales.

15 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar la fracción soluble en acetona procedente de *Ulmus wallichiana* en una forma farmacéuticamente aceptable con el fin de mejorar su aplicación potencial para el tratamiento o la prevención del tratamiento o cura de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno, preferentemente en la prevención o tratamiento de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno provocados en seres humanos o animales, y la obtención de PBM durante el crecimiento y salud del esqueleto en seres humanos y animales.

20 Otro objetivo de la invención es proporcionar compuestos puros individuales procedentes de *Ulmus wallichiana* en forma farmacéuticamente aceptable con el fin de mejorar su aplicación potencial para el tratamiento o prevención o cura de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno, preferentemente en la prevención o tratamiento de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno provocados en seres humanos y animales, y la obtención de PBM durante el crecimiento y salud del esqueleto en
25 seres humanos y animales.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un cóctel de dos o más compuestos puros procedentes de *Ulmus wallichiana*, en una proporción o proporciones apropiadas, en una forma farmacéuticamente aceptable con el fin de mejorar su aplicación potencial para el tratamiento o prevención o cura de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno en la prevención o tratamiento de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno provocados en seres humanos y animales, y la obtención de PBM durante el crecimiento y la salud del esqueleto en seres humanos y animales.

30 Por consiguiente, la presente invención proporciona un extracto puro o una fracción soluble en acetona o compuestos puros individuales o cóctel de proporción o proporciones apropiadas de dos o más compuestos puros procedentes de *Ulmus wallichiana* en forma farmacéuticamente aceptable para mejorar su aplicación potencial para el tratamiento o la prevención o cura de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno preferentemente en la prevención o tratamiento de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno provocados en seres humanos y animales, y la obtención de PBM durante el crecimiento y salud del esqueleto en seres humanos y animales, por medio del procedimiento y los métodos descritos en la presente invención.

35 En una realización de la invención el extracto puro útil para el tratamiento o la prevención o cura de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno preferentemente en la prevención o tratamiento de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno provocados en seres humanos y animales, y la obtención de PBM durante el crecimiento y salud del esqueleto en seres humanos y animales, se prepara a partir de corteza de tallo y ramitas de la planta *Ulmus wallichiana*.

45 En otra realización de la invención la fracción soluble en acetona, útil para el tratamiento o la prevención o cura de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno preferentemente en la prevención o tratamiento de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno provocados en seres humanos y animales, y la obtención de PBM durante el crecimiento y salud del esqueleto en seres humanos y animales, se prepara a partir del extracto puro a partir de
50 corteza de tallo y ramitas de la planta *Ulmus wallichiana*.

55 En otra realización de la invención los compuestos puros individuales, útiles para el tratamiento o la prevención o cura de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno preferentemente en la prevención o tratamiento de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno provocados en seres humanos y animales, y la obtención de PBM durante el crecimiento y salud del esqueleto en seres humanos y animales, proceden del extracto puro o la fracción soluble en acetona de la corteza de árbol y ramitas de la planta *Ulmus wallichiana*.

60 En otra realización de la invención las proporciones y concentración absoluta de los compuestos puros individuales en el extracto puro o fracción soluble en acetona de *Ulmus wallichiana* y útiles para el tratamiento o la prevención o
65

cura de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno preferentemente en la prevención o tratamiento de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno preferentemente en la prevención o tratamiento de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno provocados en seres humanos y animales, y la obtención de PBM durante el crecimiento y salud del esqueleto en seres humanos y animales, se han obtenido usando un método de cuantificación basado en HPLC.

En otra realización de la invención los compuestos puros individuales del extracto puro o la fracción soluble en acetona de *Ulmus wallichiana* se evaluaron *in vitro* e *in vivo* usando protocolos y procedimientos bien establecidos para establecer y demostrar su utilidad en el tratamiento o la prevención o cura de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno preferentemente en la prevención o tratamiento de síndromes o trastornos o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno provocados en seres humanos y animales, y la obtención de PBM durante el crecimiento y salud del esqueleto en seres humanos y animales.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de explicación y no deberían limitar el ámbito de la presente invención.

Ejemplos

1.Extracción a partir de corteza de tallo

Se colocó corteza de tallo en forma de polvo de *Ulmus wallichiana* (Código de planta N°. 914, 5 kg) en un percolador de vidrio con etanol (20 l) y se permitió el reposo a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 horas (durante la noche). Se recogió la fracción percolada. Se repitió este procedimiento de extracción durante cuatro veces. Se filtró el extracto combinado, se concentró a 45 °C; peso de extracto obtenido 660 g (13,2 %, 914-C002).

2.Extracción a partir de ramitas

Se colocaron ramitas en forma de polvo de *Ulmus wallichiana* (Código de planta N°. 4669,4 kg) en un percolador de vidrio con etanol (18 l) y se permitió el reposo a temperatura ambiente durante 16 horas (durante la noche). Se recogió la fracción percolada. Se repitió el procedimiento de extracción cuatro veces. Se filtró el extracto combinado, se concentró a 45 °C; peso del extracto obtenido 350 g (8,7 %, C002).

3.Fraccionamiento

Se trituró el extracto etanólico (914-C002, 100 g) con hexano (200 ml x 5). Posteriormente, se concentró la fracción soluble en hexano a presión reducida a 40 °C, peso de fracción de hexano obtenida 10 g (10 %, F003). A continuación, se disolvió el residuo obtenido tras la trituración con hexano en agua (500 ml), se precipitó con adición de n-butanol (500 ml). Se filtró el sólido resultante, se lavó con agua destilada. Se obtuvo el compuesto puro por medio de cristalización con una mezcla de metanol y acetato de etilo, se obtuvieron 2,6 g (2,6 %, K058). Se concentró el filtrado usando un evaporador rotatorio a 45 °C. Se trituró el residuo con acetona (200 ml x 4). Se concentró la fracción soluble en acetona combinada a presión reducida. Peso de fracción soluble en acetona obtenida 69,0 g (F004) y fracción soluble en acetona obtenida 18,4 g (F005).

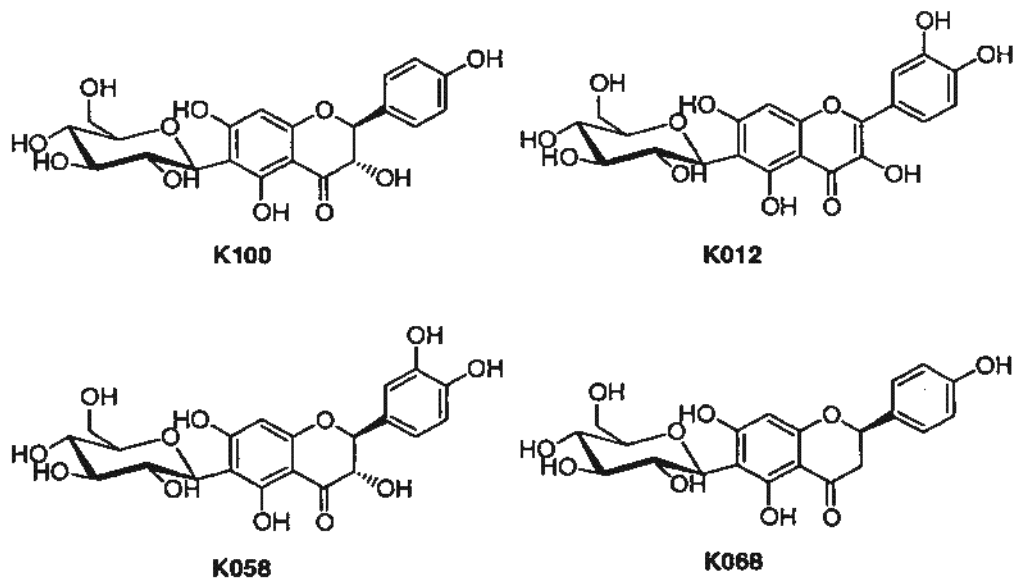
La Figura 1 representa un diagrama esquemático que muestra las estrategias de extracción, fraccionamiento y aislamiento de *Ulmus wallichiana*.

Figura 1: Diagrama de flujo que muestra la extracción, fraccionamiento y aislamiento de extracto crudo y fracciones puras de corteza de tallo de *Ulmus wallichiana*.

4. Aislamiento de compuestos a partir de fracción soluble en acetona (F004) de *Ulmus wallichiana*

La cromatografía de la fracción soluble en acetona (69,0 g) sobre gel de sílice (malla metálica, 230-400), empleando una mezcla de CHCl₃ hasta CHCl₃:MeOH ((5 % ac.)), permitió K068 (0,200 g, (0,2 %) usando CHCl₃: (5 %) de MeOH ac (93:7) como eluyente, K100 (0,20 g, 0,20 %) usando CHCl₃: (5 %) de MeOH ac (90:10) como eluyente y K012 (2,5 g, 2,5 %) usando CHCl₃ (5 %) de MeOH ac (87:13) como eluyente. Se caracterizaron estos compuestos a partir de estudios espectroscópicos detallados. K058 y K100 son nuevos compuestos y K068 y K012 son compuestos conocidos.

Datos físicos y espectrales de compuestos aislados



5. Caracterización de K012, K058, K068 y K100

5

K058: (2S,3S)-(+)-3',4',5,7-tetrahidroxihidroflavonol-6-C-β-D-glucopiranosido.

Rendimiento: 2,6 g. (2,6%); amorfo; UV λ_{\max} MeOH: 290, 327 nm; $[\alpha]_D^{25} +1,33^0$ (c, 0,098; MeOH); CD (MeOH) $\Delta\epsilon_{304} +36,27$ $\Delta\epsilon_{332} -12,21$. FAB-MS: m/z 467[M+1]⁺; C₂₁H₂₂O₁₂; ¹H RMN: (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 4,92 (1H, d, J=10,1Hz, H-2), 4,49 (1H, m, H-3), 5,92 (1H, s, H-8), 6,87 (1H, s, H-5'), 6,74 (2H, s, H-2', 6'), 4,87 (1H, m, H-1" junto con señal de OH), 3,14 (2H, m, H-2", 5"), 3,48 (1H, m, H-3"), 3,67 (1H, m, H-4"), 4,01 (1H, m, H-6"a), 4,47 (1H, m, H-6"b), 12,48 (1H, s, OH-5), 9,11 (1H, s, OH-3), 9,05 (1H, s, OH-3'), 4,84 (1H, as, OH), 4,62 (1H, as, OH). ¹³C RMN: (DMSO-d₆, 75MHz) δ : 83,0 (C-2), 71,63 (C-3), 197,9 (C-4), 162,6 (C-5), 106,0 (C-6), 166,0 (C-7), 94,8 (C-8), 161,3 (C-9), 100,2 (C-10), 128,0 (C-1'), 115,3 (C-2'), 145,8 (C-3'), 145,0 (C-4'), 115,3 (C-5'), 119,4 (C-6'), 72,9 (C-1"), 70,7 (C-2"), 79,1 (C-3"), 70,3 (C-4"), 81,5 (C-5"), 61,6 (C-6").

10

15

K012: (6-Glucopiranosil-3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona):

Rendimiento: 2,5 g. (2,5%); amorfo; UV λ_{\max} MeOH: --- nm; $[\alpha]_D^{25} +9,79^0$ (c, 0,0612; DMSO); FAB-MS: m/z 465[M+1]⁺; C₂₁H₂₀O₁₂; ¹H RMN: (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 6,48 (1H, s, H-8), 7,65 (1H, d, J=2,1Hz, H-2'), 6,88 (1H, d, J=8,5Hz, H-5'), 7,54 (1H, dd, J=8,5, 2,1 Hz, H-6'), 4,59 (1H, d, J=9,6 Hz, H-1"), y otros protones suger están en 4,05-3,20 (5H, m, H-2"-6"), 13,06 (1H, s, OH-12), 9,35 (1H, s, OH-3). ¹³C RMN: (DMSO-d₆, 75 MHz) δ : 144,2 (C-2), 134,7 (C-3), 175,2 (C-4), 159,0 (C-5), 107,2 (C-6), 162,2 (C-7), 92,2 (C-8), 154,2 (C-9), 101,8 (C-10), 121,0 (C-1'), 114,7 (C-2'), 145,7 (C-3'), 146,8 (C-4'), 114,1 (C-5'), 119,2 (C-6'), 72,2 (C-1"), 69,7 (C-2"), 78,1 (C-3"), 69,3 (C-4"), 80,7 (C-5"), 60,6 (C-6").

20

25

K068: (6-Glucopiranosil-4', 5, 7-trihidroxiflavona):

Rendimiento: 0,200 g. (0,2%); pf: 195-196 °C; UV λ_{\max} MeOH: 292, 328 nm; $[\alpha]_D^{25} +29,32^0$ (c, 0,133; MeOH); FAB-MS: m/z 435[M+1]⁺; C₂₁H₂₂O₁₀; ¹H RMN: (CD₃OD, 300 MHz) δ : 5,35 (1H, dd, J=12,4, 2,3Hz, H-2), 2,75 (1H, dd, J=2,3,17,1Hz, H-3a), 3,14 (1H, dd, J=12,4, 17,1Hz, H-3b), 5,98 (1H, s, H-8), 7,32 (2H, d, J=8,4Hz, H-2', 6'), 6,82 (2H, d, J=8,4, H-3', 5'), 4,79 (1H, d, J=9,4Hz, H-1"), 4,11 (1H, m, H-2"), 3,45 (1H, m, H-3"), 3,30 (2H, m, H-4", 5"), 3,86 (1H, dd, J=2,2,12,3Hz, J=5,2, 12,3Hz, H-6"b), 3,73 (1H, m, H-6"a); ¹³C RMN: (CD₃OD, 75 MHz) δ : 82,9 (C-2), 44,0 (C-3), 198,2 (C-4), 164,3 (C-5), 106,1 (C-6), 167,4 (C-7), 96,5 (C-8), 159,1 (C-9), 103,4 (C-10), 131,0 (C-1'), 129,1 (C-2'), 116,1 (C-3'), 164,6 (C-4'), 116,1 (C-5'), 129,1 (C-6'), 75,3 (C-1"), 72,7(C-2"), 80,2 (C-3"), 71,9 (C-4"), 80,0 (C-5"), 63 (C-6").

30

35

K100: (2S, 3S)-(+)-4',5,7-trihidroxidihidroflavonol-6-C-β-D-glucopiranosido

Rendimiento: 0,20 g. (0,20%); amorfo; UV λ_{\max} MeOH: 296, 334 nm; $[\alpha]_D^{25} +48,690$ (c, 0,115; MeOH); CD (MeOH) $\Delta\epsilon_{299} +27,35$ $\Delta\epsilon_{328} -15,56$. FAB-MS: m/z 451[M+1]⁺; C₂₁H₂₂O₁₁; ¹H RMN: (CD₃OD, 300 MHz) δ : 4,95 (1H, d, J=11,3Hz, H-2), 4,55 (1H, d, J=11,3Hz, H-3), 5,95 (1H, s, H-8), 7,34 (2H, d, J=8,5Hz, H-2', 6'), 6,83 (2H, d, J=8,5Hz, H-3', 5'), 4,82(1H, m, H-1" junto con señal de OH), 4,13 (1H, t, J=9,1Hz, H-2"), 3,86 (1H, dd, J=2,1, 12,3Hz, H-6"a), 3,71 (1H, dd, J=4,9,12,3Hz, H-6"b), 3,45-3,35 (3H, m, H-3", 4", 5"), ¹³C RMN: (CD₃OD, 75 MHz), δ : 85,0 (C-2), 72 (C-

40

3), 198,9 (C-4), 163,9 (C-5), 106,3 (C-6), 167,4 (C-7), 96,4 (C-8), 159,2 (C-9), 101,8 (C-10), 129,2 (C-1'), 130,4 (C-2'), 116,2 (C-3'), 164,1 (C-4'), 116,2 (C-5'), 130,4 (C-6'), 75,2 (C-1''), 72,6 (C-2''), 80,2 (C-3''), 71,9 (C-4''), 82,6 (C-5''), 62,9 (C-6'').

5 6. Cuantificación de K058, K012, K068, K100 en extracto puro y en fracción soluble en acetona

Se empleó un método analítico basado en HPLC-PDA para la cuantificación absoluta de K012, K058, K068, K100 en el extracto puro y fracción soluble en acetona. Se llevó a cabo el análisis en columna C-18 usando metanol:agua como fase móvil con un caudal de 0,5 ml por minuto. Los marcadores individuales K012, K058, K068, K100 aparecieron a $15 \pm 0,8$, $8,3 \pm 0,8$, $14,3 \pm 0,8$ y $10 \pm 0,8$ minutos respectivamente en el cromatograma. Se establecieron la exactitud y precisión de los marcadores puros individuales K058, K012, K068, K100 por medio de análisis de intradía e inter-días en el intervalo de concentración de 0,5-1,6 $\mu\text{g/ml}$ con un coeficiente de correlación de 0,99 o mejor. Se analizaron los extractos puros y la fracción soluble en acetona utilizando el método anterior y se extrapolaron las concentraciones absolutas de estos cuatro componentes marcadores en los extractos puros y las fracciones solubles en acetona a partir del gráfico de linealidad. Se encontró que K012, K058, K068, K100 estaban presentes en el intervalo de concentración de 6,7-9 %, 3,3-4,5 %, 0,6-0,7 % y 1,7-2,6 % respectivamente, en el extracto puro y dentro del intervalo de 7,9-12 %, 1,7-3,0 %, 0,7-1,2 % y 2,5-4,5 % respectivamente en la fracción soluble en acetona.

7. Evaluación biológica

Se evaluaron los extractos vegetales y el compuesto puro de la presente invención para el uso de trastornos o síndromes o enfermedades dependientes o independientes de estrógeno, preferentemente en la prevención o tratamiento de trastornos o síndromes o enfermedades dependientes o independientes de estrógenos provocadas en seres humanos y animales, y la obtención de PBM durante el crecimiento y salud del esqueleto en mamíferos. Los procedimientos detallados para la evaluación del extracto etanólico de corteza de tallo y los compuestos aislados de la presente invención se describen a continuación. El ensayo de actividad ilustrado en los siguientes ejemplos no debería, no obstante, limitar el ámbito de la invención.

7.1. Procedimiento de ensayo para la determinación de actividad osteogénica y de formación ósea

Se preparan disoluciones de ensayo de los extractos de ensayo de la presente invención en sulfóxido de dimetilo (una reserva de 10 mM) y se diluyen en medio de cultivo a concentraciones de 1 nM y 100 nM para evaluación de la actividad de formación ósea *in vitro*. En los experimentos de control, se usó la misma concentración de DMSO en lugar del agente de ensayo.

7.2. Cultivo celular de osteoblasto

Los osteoblastos surgen de hemocitoblastos mesenquimales pluripotentes. Una de las fuentes más ricas de pre-osteoblastos es la bóveda craneal de ratas o ratones recién nacidos. Los osteoblastos también están presentes en la médula ósea. Durante el curso del cultivo, los pre-osteoblastos experimentan tres etapas características de osteoblastos con la expresión de genes específicos de etapa. Estas son:

- Proliferación & diferenciación: Días 1-12
- Genes – Fostasa alcalina, Colágeno-I, osteocalcina, etc.

- Maduración de matriz extra-celular:
- Días 12-18

Genes – Osteocalcina, Osteopontina, Fibronectina.

- Mineralización: Días 14-35

Característica – Calcificación (formación de nódulos)

No se incluyó el extracto etanólico en estudios *in vitro* ya que se encontró que precipitaba en el medio de cultivo incluso a una dilución de 0,0025 %, del modo más probable debido a la abundancia de grupos no polares. Por tanto, los inventores sometieron a ensayo los compuestos puros en osteoblastos y pre-adipocitos.

7.3. Tratamiento de extracto puro (C002) de *Ulmus wallichiana* en ratas de Sprague Dawley sometidas a ovariectomía

Se proporcionaron, diariamente, extractos etanólicos de C002 a dosis de 500- & 700 mg/kg de peso corporal, por ruta oral, a ratas de Sprague Dawley (180-200 g) tras ovariectomía bilateral (Ovx). Este es el modelo animal más ampliamente usado para osteopenia (pérdida ósea) que reproduce el estado de pérdida ósea pos-menstrual en seres humanos. Se proporcionó el extracto en goma arábica (vehículo). Se usaron ratas de operación simulada y ratas Ovx como controles y se proporcionó únicamente goma arábica. Cada grupo consistió en 10 ratas y los grupos

fueron los siguientes: simulación intacta, Ovx, Ovx + 500 mg/kg de extracto y Ovx + 750 mg/kg de extracto. El tratamiento comenzó 24 horas después de la cirugía y continuó durante 90 días. Trascorridos 90 días, en primer lugar se aclimataron las ratas y posteriormente se mantuvieron en jaulas metabólicas sin otro alimento que agua durante 24 h para recoger muestras de orina. Trascorridas 24 h, se volvieron a colocar las ratas en las jaulas con alimento y agua a demanda con administración oral del extracto como anteriormente durante 24 horas adicionales. A continuación, se sacrificaron las ratas y se realizó la autopsia para recoger sangre, hueso (tibia, fémur, vértebras L1-L4) y útero.

7.4. Medición de la densidad mineral ósea (BMD)

Se determinó la densidad mineral ósea de fémur (global, cabeza, cuello), tibia (global, cabeza, punto de separación tibio-fibular) y vértebra lumbar (LV1, LV2, LV3, LV4) por medio de DEXA.

7.5. Tratamiento de C002 y F004 (fracción de C002) en ratas de Sprague Dawley en crecimiento

Se dividieron ratas de Sprague Dawley hembras de 21 días en tres grupos, consistiendo cada grupo en 10 ratas; control (tratado con vehículo), 750 mg/kg de extracto puro C002 y 50 mg/kg de 914/F004. Se proporcionaron vehículos o tratamientos diariamente por medio de ruta oral en goma arábica durante 30 días. Tras completar los 30 días se sacrificaron las ratas y se recogieron tres huesos (fémur, tibia, vértebras L1-L4).

7.6. Medición de la densidad mineral ósea (BMD)

Se determinó la densidad mineral ósea de fémur (global, cabeza, cuello), tibia (global, cabeza, punto de separación tibio-fibular) y vértebra lumbar (LV1, LV2, LV3, LV4) por medio de DEXA.

7.7. Cultivos ex-vivo de médula ósea para cuantificación de ALP (fosfatasa alcalina) y mineralización in vitro a partir de ratas inmaduras tratadas con C002

Se recogieron de forma aséptica fémur derecho de control y ratas tratadas con C002, en PBS, durante la autopsia de las ratas. Se retiró el tejido blando, y se pinzaron los extremos del fémur usando tijeras estériles, se creó un orificio en el extremo de la articulación de la rodilla de cada hueso con una aguja, y se lavó la médula del eje con medio de control (CM) que consistió en α -MEM complementado con 10 % de suero de ternera fetal, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU). Se suspendieron las células en este medio, y se centrifugaron las suspensiones a 800 rpm durante 5 minutos. Se re-suspendieron las células en CM nuevo y se contaron usando un hemocitómetro. Se cultivaron 100000 y 200000 células/cultivo en placas de 48 y 12 pocillos, respectivamente, y en una atmósfera humidificada, con 5 % de CO₂, a 37 °C en CM complementado con 10 mM de β -glicerofosfato, 50 μ g/ml de ácido L-ascórbico y 10⁻⁸ M de dexametasona. Se sustituyó este medio todos los días (John et al., 2002; Connolly, 1995; Gebhart y Lane, 1991; Gurpinar et al., 2003; Lan y Wang, 2003). Se mantuvieron las células durante 9 días para actividad de ALP. Se determinó la actividad de ALP como se describe por parte de Akiyama et al., con modificaciones. Brevemente, se lavaron las células una vez con PBS, posteriormente, se midió la actividad de ALP por medio de adición de un tampón ALP (dietanolamina 1 M, 0,5 M de MgCl₂, 1 mg/ml de PNPP, pH 9,0), incubando a 37 °C y se leyó la absorbancia (405 nm) usando un espectrómetro de microplacas. Se determinó la significancia estadística por medio de ensayos de t-Student con emparejamiento de dos colas.

Para la mineralización in vitro, se mantuvieron las células como se ha descrito anteriormente durante 21 días seguido de fijación (4 % de HCHO en PBS durante 20 minutos). A continuación, se lavaron las células con agua nanopura y se tiñeron durante 10 minutos con rojo-S de alizarina 40 nM, pH 4,2, a temperatura ambiente. Se lavaron las muestras cinco veces con agua. Se tomaron microfotografías de las paredes teñidas. Posteriormente, se extrajo el rojo-S de alizarina usando cloruro de cetilpiridinio de 10 % (peso/volumen) (CPC) en fosfato de sodio 10 nM, pH 7,0, durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se leyeron las disoluciones resultantes en un lector de Microplacas con una longitud de onda de ensayo de 540 nm frente a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

7.8. Cultivos de osteoblastos primarios

Se preparan cultivos celulares de bóveda craneal de ratas neonatas como se ha descrito con anterioridad (Chattopadhyay et al., Endocrinology 145:3451-62, 2004) usando una ligera modificación. Brevemente, para los cultivos de osteoblastos de bóveda craneal, se sometieron a digestión los huesos frontal y parietal procedentes de ratas de Sprague-Dawley (1-3 días de edad) en 0,1 % de colagenasa/0,1 % de dispasa en α -MEM para obtener 5 fracciones digeridas secuenciales. Se combinan las fracciones digeridas segunda a quinta y se someten a crecimiento hasta confluencia a 37 °C y 5 % de CO₂ en aire en α -MEM, complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS), 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina-estreptomycin, disolución de amino ácidos no esenciales y piruvato de sodio.

7.9. Ensayo de proliferación celular BrdU

Se usa ensayo BrdU para medir la proliferación celular basada en la incorporación de BrdU durante la síntesis de ADN en células en proliferación (Chattopadhyay et al., Endocrinology 145:3451-62, 2004). Se sembraron

osteoblastos de bóveda craneal en placas de 96 pocillos (2000 células/pocillo). Se permitió que las células se unieran durante 24 horas y, tras ello, se sometieron a inanición en 0,5 % de FCS que contenía medio α -MEM seguido de tratamiento de K058 a varias concentraciones durante 24 horas, después de lo cual se determinó la proliferación de células por medio de un método ELISA BrdU como se describe por el fabricante (Roche Biochemicals, Rotkreuz, Suiza). Cuatro horas antes de completar la reacción, se añadió una disolución de BrdU. Se llevó a cabo la incubación BrdU durante 4 horas, se fijaron las células y se desnaturalizó y posteriormente se trató con anticuerpo anti-BrdU y se detectaron complejos inmunes por medio de la reacción de sustrato. Se midió la absorbancia a 370 nm.

7.10. Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina

Para el ensayo de fosfatasa alcalina (ALP), se colocaron osteoblastos en placas de 96 pocillos (2000 células/pocillos) en medio de crecimiento regular. Veinticuatro horas más tarde, cuando las células formaron una monocapa confluyente, se substituyó el medio con medio α -MEM complementado con 10 % de FBS, 10 mM de β -glicerofosfato y 50 μ g/ml de ácido ascórbico. Se proporcionó tratamiento con concentración variable del compuesto de ensayo K012, K058, K068 y K100 a concentración 1 nM y 100 nM. Cuarenta y ocho después de la inducción, se determinó la actividad de ALP de los osteoblastos como se describe por parte de Akiyama et al (Exp Cell Res 235:362-369, 1997) con ligeras modificaciones. Brevemente, se lavaron las células una vez con PBS y se midió la actividad ALP por medio de adición de tampón ALP (dietanolamina 1 M, 0,5 mM de $MgCl_2$, 1 mg/ml de PNPP, pH 9,0), incubando a 37 °C, y se midió la absorbancia (405 nm) usando un espectrofotómetro de microplacas. Se determinó la significación estadística por medio de ensayos de t-Student con emparejamiento de dos colas.

7.11. Mineralización in vitro procedente de osteoblastos de bóveda craneal

La capacidad de las células para producir matriz mineralizada es importante con respecto al desarrollo de materiales para regeneración ósea. Se determinó la mineralización de matriz extracelular por medio de osteoblastos usando ensayo de rojo-S de alizarina (AR-S) combinado con extracción con cloruro de cetilpiridinio (CPC). (Stanford et al., J. Biol. Chem. 270:9420-9428; 1995). El rojo de alizarina es un colorante que se une selectivamente a sales de calcio nativas y se usa ampliamente para histoquímica mineral de calcio. Se sembraron células en una placa de seis pocillos que contenía 1000 células/pocillo en medio de cultivo complementado con 10 mM de β -glicerofosfato y 50 μ g/ml de ácido ascórbico con compuestos de ensayo K012, K058, K068 y K0100 a concentraciones 1 nM y 100 nM. Se proporcionó el tratamiento durante 21 días y tras completarlo se lavaron las muestras con PBS seguido de fijación (HCHO de 4 % durante 20 minutos). Se tomaron microfotografías de las paredes teñidas. Posteriormente, se sometió a extracción la tinción con rojo-S de alizarina usando cloruro de cetilpiridinio de 10 % (peso/volumen) (CPC) en fosfato de sodio 10 nM, pH 7,0, durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se leyeron las disoluciones resultantes en un lector de Microplacas con una longitud de onda de ensayo de 540 nm frente a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Los nódulos de mineralización también se observaron por medio del procedimiento de tinción de de Von kossa (A. M. Chou et al. Materials Science and Engineering C 20 (2002) 77-83). Trascorridos 21 días de cultivo, se lavaron las células de cultivos tisulares con PBS y se sumergieron en disolución de nitrato de plata de 5 % (peso/volumen) durante 45 minutos. Tras lavar con agua destilada, se fijaron en formalina y bicarbonato de sodio de 5 % (peso/volumen) durante 8 minutos. Finalmente, se sumergieron en disolución de tiosulfato de sodio de 5 % (peso/volumen) durante 5 minutos y se lavaron abundantemente con agua durante 15 minutos y se tomaron microfotografías.

7.12. Mineralización in vitro a partir de médula ósea de ratón

Se usaron ratones adultos balbc/c en este estudio. Se recolectaron células de médula ósea (BMC) procedentes de fémur y tibias de animales, como queda descrito (Maniopoulos et al., Cell Tissue Res 1988; 254:317-30; Ishaug et al., J Biomed Mater Res 1997; 36:17-28). Brevemente, se obtienen escisiones asépticas de las extremidades traseras de los ratones tras eutanasia con éter. Se retiró el tejido blando, y se pinzaron el extremo proximal de fémur y el extremo distal de la tibia usando tijeras estériles, se creó orificio en cada extremo de la articulación de la rodilla de cada hueso con una aguja, y se lavó la médula procedente del eje con medio de control (CM) que consistió en α -MEM complementado con 10 % de suero de ternera fetal, 100 U/ml penicilina, 100 U/ml de estreptomycin (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU). Se suspendieron las células en este medio, y se combinaron las suspensiones de células de todos los huesos en un tubo de centrifuga. Se centrifugó la suspensión a 800 rpm durante 5 minutos. Se contaron las células usando un hemocitómetro. Se aspiró el sobrenadante, y se re-suspendió el microgránulo en CM nuevo y se sembró en placas de 12 pocillos. Se sometieron a cultivo 2000 células/pocillo en placas de 12 pocillos en una atmósfera humidificada, con 5 % de CO_2 a 37 °C en el mismo medio complementado con β -glicerofosfato 10 mM, ácido L-ascórbico 50 μ g/ml y 10^{-8} M de dexametasona con diferente concentración del compuesto de ensayo. Se substituyó este medio todos los días (John et al., Trends Biomater. Artif. Organs 2002; 16(1):28-33); Conolly, Clin Orthop 1995:313: 818; Gebhart y Lane, Acta Orthop Belg 1991; 57(2): 130-43; Gurpinar et al., Biomater Appl 2003; 18(1): 25-33; Lan y Wang, Blood Substitutes, Biotechnol 2003; 31(1): 59-68). Se proporcionaron los tratamientos con K012, K058, K068 y K0100 a concentración de 1 nM y 100 nM durante 21 días y tras completar el tratamiento se lavaron las muestras con PBS seguido de fijación (HCHO de 4 % durante 20 minutos). A continuación, se lavaron las muestras con agua nanopura y se tñieron durante 10 minutos con AR-S 40

mM, pH 4,2, a temperatura ambiente. Se proporcionó el tratamiento durante 21 días y tras completarlo se lavaron las muestras de tratamiento con PBS seguido de fijación (HCHO de 4 % durante 20 minutos). Se tomaron microfotografías de las paredes teñidas. Posteriormente, se sometió a extracción la tinción con rojo-S de alizarina usando CPC de 10 % (peso/volumen) en fosfato de sodio 10 nM, pH 7,0, durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se leyeron las disoluciones resultantes en un lector de Microplacas con una longitud de onda de ensayo de 540 nm frente a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

7.13A. Adipogénesis In vitro

Se sometieron a cultivo células de preadipocito 3T3-L1 hasta confluencia. Dos días después de que las células alcanzaran confluencia se consideró como día 0. En el día 0, se trataron las células con el medio de inducción [suero de ternera de 10 %/DMEM que contenía 1 µg/ml de insulina, 1 µM de dexametasona y 500 µM de isobutilmetilxantina (IBMX)]. Dos días después de la inducción del tratamiento con el medio (día 2) se trataron las células con insulina [suero de ternera de 20 %/DMEM que contenía 1 µg/ml de insulina. Normalmente, se logró la diferenciación completa tras 8 días a partir del día 0. Para someter a ensayo el efecto del compuesto de ensayo tras la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 hasta adipocitos, se usaron los compuestos de ensayo K068 y K100 en concentraciones de 1 µM, 100 nM, en diferentes concentraciones durante toda la diferenciación (durante 8 días a partir del día 0). Para la evaluación de adipogénesis se fijaron las células diferenciadas en paraformaldehído de 4 % peso/volumen durante 20 minutos, se lavó con PBS y se sometió a tinción con Rojo O Oil de 0,34 % en isopropanol de 60 % durante 15 minutos. A continuación, se lavó con PBS tres veces y se sometió a extracción la tinción con isopropanol de 80 % manteniéndolo a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador orbital. Se tomó OD del colorante extraído a 520 nm.

7.13B. Reacción en cadena de transcriptasa polimerasa inversa (RT-PCR)

Se llevó a cabo RT-PCR para evaluar la expresión de PPAR-γ (**proliferador de peroxima-receptor activado**) y adiponectina. Se usó el gen GAPDH de iniciación como control terminal en este estudio. Se prepararon cultivos de preadipocitos 3T3-L1 en estado de diferenciación para formar adipocitos en presencia de K068 y K100 en concentraciones de 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-9} M durante 8 días. Tras el cultivo, se sometió a extracción ARN celular y se llevó a cabo RT-PCR usando un estuche (Fermentas) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo PCR usando los oligonucleótidos listados en la **Tabla 1**.

Tabla 1 Secuencias de primero para RT-PCR

Gen	Secuencia	Nº Acceso.	amplicon
GAPDH	F: CGATCCCGCTAACATCAAAT	XR_009174.1	460
	R: GGATGCAGGGATGATGTTCT		
PPAR-γ	F: GTTCATGCTTGTGAAGGATGC	NM_011146.2	249
	R: ACTCTGGGTTTCAGCTGGTCG		
Adiponectina	F: CGCCTTATGTGTATCGCTCAG	NM_009605.4	390
	R: TGCATAGAGTCCATTGTGGTCCC		
RT PCR semi-cuantitativo			

7.14. Reacción en cadena de transcriptasa polimerasa inversa (RT-PCR)

Se llevó a cabo RT-PCR para evaluar los niveles de ARNm de Col1 (colágeno tipo I), Cbfa-1 (factor de enlace de núcleo-1), ALP (fosfatasa alcalina), OPN (osteopontina), BMP 2 (proteína morfogénica ósea 2), OPG (osteoprotegrina) y OCN (osteocalcina). Se usó el gen GAPDH de iniciación (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) como control interno en este estudio. Se extrajeron ARN a 0, 4, 8, 12, 24 y 48 horas. Se extrajo el ARN total usando reactivo TRIzol (Invitrogen). Se usó un estuche RT PCR de etapa individual (Qiagen) para llevar a cabo RT-PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación se usaron los pares de primero específicos para genes (**Tabla 2**).

Tabla 2: Secuencias de primero para RT-PCR

Gen	Secuencia	Nº. Acceso	amplicon	
5	GAPDH bp	F: CGATCCCGCTAACATCAAAT	<u>XR_009174.1</u>	460
		R: GGATGCAGGGATGATGTTCT		
10	OPG bp	F:TGGCACACAGTGATGAATGCG	<u>U94330.1</u>	550
		R:GCTGGAAAGTTTGCTCTTGCG		
15	Cbfa-1 bp	F:GCCGGGAATGATGAGAACTA	<u>XM_001066909.1</u>	199
		R:GGACCGTCCACTGTCACTTT		
20	Col 1 bp	F:TAAAGGGTCATCGTGCTTC	<u>BC133728.1</u>	499
		R:ACTCTCCGCTCTTCCAGTCA		
25	OPN bp	F:AAGCCTGACCCATCTCAGAA	M99252.1	481
		R:GCAACTGGGATGACCTTGAT		
	OCN bp	F:AGCGACTCTGAGTCTGACAAA	<u>M25490.1</u>	524
		R:AACGGTGGTGCCATAGATGCG		
	BMP 2 bp	F:ACTGCGGTCTCCTAAAGGTC	<u>NM_017178.1</u>	250
		R:GCGGTACAGGTCGAGCATAT		
	ALP bp	F:CGTCTCCATGGTGGATTATGC	J03572	101
		R:TGGCAAAGACCGCCACAT		

7.15. Carácter estrogénico in vitro

Se induce la expresión de fosfatasa alcalina en células de Ishikawa en respuesta a estrógenos o sustancias parecidas a estrógenos (Littlefield et al., Endocrinology. 1990 Dic; 127(6): 2757-62). Se colocaron las células de Ishikawa en placas de microvaloración de fondo plano de 96 pocillos a una densidad de 5000 células/pocillo y se obtuvieron cultivo en DMEM libre de rojo de fenol que contenía FCS tratado con 10 % de carbón vegetal. Trascurridas 24 horas de estancia en placa, se sub-alimentaron con suero las células durante 12 horas. Posteriormente, para evaluar el carácter estrogénico de los compuestos, se trataron las células con diferentes concentraciones (10^{-6} a 10^{-11} M) de compuestos puros K058 y K012. También se usaron las mismas concentraciones de Raloxifeno con fines de comparación. Se usó la concentración de estrógenos de 10^{-8} M como control positivo. Se llevaron a cabo tratamientos de compuesto durante 72 horas a 37 °C en un incubador de CO₂. Se repitieron los experimentos 4 veces. Para los estudios de carácter anti-estrogénico, se añadieron los compuestos K012 y K058 a 10^{-6} y 10^{-11} M con estrógeno 10^{-8} M. Trascurridas 72 horas de incubación, se retiró el medio y se lavaron las placas dos veces con PBS y se secaron presionando de forma suave. Se logró la fractura por congelación de las células colocando las placas a -70 °C durante 15 minutos seguido de ascenso hasta temperatura ambiente. A continuación, se colocaron las placas en hielo y se añadieron a cada pocillo 50 µl de disolución de dietanolamina enfriada en hielo (fosfato de P- nitrofenilo 5 mM (PNP) y MgCl₂ 0,25 mM en dietanolamina 1 M). Posteriormente, se colocaron las placas a 37 °C durante 30 minutos para el desarrollo de color (amarillo) que es una función de la actividad de ALP. Se midió la absorbancia a 405 nm.

7.16. Tratamiento de K058 en ratas de Sprague Dawley sometidas a ovariectomía

Se proporcionó, diariamente, por ruta oral, K058 a una concentración de 1 a 10 mg/kg de peso corporal, a ratas de Sprague Dawley (180-200 g) tras ovariectomía bilateral (Ovx). Este es el modelo animal más ampliamente usado para osteopenia (pérdida ósea) que reproduce el estado de pérdida ósea pos-menstrual en seres humanos. Se proporcionó el extracto en goma arábica (vehículo). Se usaron ratas de operación simulada y ratas Ovx como controles y se proporcionó únicamente goma arábica. Cada grupo consistió en 10 ratas y los grupos fueron los siguientes: simulación intacta, Ovx, Ovx + 1 mg/kg de K058 y Ovx + 5 mg/kg de K058. El tratamiento comenzó 24 horas después de la cirugía y continuó durante 90 días. Trascurridos 90 días, en primer lugar se aclimataron las ratas y posteriormente se mantuvieron en jaulas metabólicas sin otro alimento que agua durante 24 h para recoger muestras de orina. Trascurridas 24 h, se volvieron a colocar las ratas en las jaulas con alimento y agua a demanda con administración oral del extracto como anteriormente durante 24 horas adicionales. A continuación, se sacrificaron las ratas y se realizó la autopsia para recoger sangre, hueso (tibia, fémur, vértebras L1-L4) y útero.

7.17. Densidad mineral ósea (BMD)

Se determinó la densidad mineral ósea de fémur (global, cabeza, cuello), tibia (global, cabeza, punto de separación tibio-fibular) y vértebra lumbar (LV1, LV2, LV3, LV4) por medio de DEXA.

7.18. Tratamiento de K058 en ratas de Sprague Dawley inmaduras

- 5 Se dividieron ratas de Sprague Dawley hembra en el momento del destete (aproximadamente 21 días) en dos grupos que consistían en 10 ratas por grupo. Se trataron las ratas de control con goma arábica (vehículo) y se trató el otro grupo con K058 a 5 mg/kg de peso corporal. Se proporcionó K058 o vehículo a todos los controles y ratas tratadas diariamente por ruta oral en goma arábica durante 30 días. Tras completar los 30 días, se sacrificaron las ratas y se recogieron sus huesos (fémur, tibia, vértebras L1-L4).

10 a) Densidad mineral ósea (BMD)

Se determinó la densidad mineral ósea de fémur (global, cabeza, cuello), tibia (global, cabeza, punto de separación tibio-fibular) y vértebra lumbar (LV1, LV2, LV3, LV4) por medio de DEXA.

b) Cultivo ex vivo de médula ósea para cuantificación de ALP y mineralización in vitro a partir de ratas inmaduras tratadas con K058

- 15 Se recogieron de forma aséptica fémur derecho de control y ratas tratadas con K058, en PBS, durante la autopsia de las ratas. Se retiró el tejido blando, y se pinzaron los extremos del fémur usando tijeras estériles, se creó un orificio en el extremo de la articulación de la rodilla de cada hueso con una aguja, y se lavó la médula del eje con medio de control (CM) que consistió en α -MEM complementado con 10 % de suero de ternera fetal, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU). Se suspendieron las células en este medio, y se centrifugaron las suspensiones a 800 rpm durante 5 minutos. Se re-suspendieron las células en CM nuevo y se contaron usando un hemocitómetro. Se cultivaron 100000 y 200000 células/cultivo en placas de 48 y 12 pocillos, respectivamente, y en una atmósfera humidificada, con 5 % de CO₂, a 37 °C en CM complementado con 10 mM de β -glicerofosfato, 50 μ g/ml de ácido L-ascórbico y 10⁻⁸ M de dexametasona. Se sustituyó este medio todos los días (John et al., 2002; Connolly, 1995; Gebhart y Lane, 1991; Gurpinar et al., 2003; Lan y Wang, 2003). Se mantuvieron las células durante 9 días para actividad de ALP. Se determinó la actividad de ALP como se describe por parte de Akiyama et al., con modificaciones. Brevemente, se lavaron las células una vez con PBS, posteriormente, se midió la actividad de ALP por medio de adición de un tampón ALP (dietanolamina 1 M, 0,5 M de MgCl₂, 1 mg/ml de PNPP, pH 9,0), incubando a 37 °C y se leyó la absorbancia (405 nm) usando un espectrómetro de microplacas. Se determinó la significancia estadística por medio de ensayos de t-Student con emparejamiento de dos colas.
- 20
- 25
- 30

7.19. Tratamiento de K012 en ratas de Sprague Dawley sometidas a ovariectomía

- Se proporcionó, diariamente, por ruta oral, K012 a una concentración de 1 a 5 mg/kg de peso corporal, a ratas de Sprague Dawley (180-200 g) tras ovariectomía bilateral (Ovx). Se proporcionó el extracto en goma arábica (vehículo). Se usaron ratas de operación simulada y ratas Ovx como controles y se proporcionó únicamente goma arábica. Cada grupo consistió en 10 ratas y los grupos fueron los siguientes: simulación intacta, Ovx, Ovx + 1 mg/kg de K012 y Ovx + 5 mg/kg de K012. El tratamiento comenzó 24 horas después de la cirugía y continuó durante 90 días. Transcurridos 90 días, en primer lugar se aclimataron las ratas y posteriormente se mantuvieron en jaulas metabólicas sin otro alimento que agua durante 24 h para recoger muestras de orina. Transcurridas 24 h, se volvieron a colocar las ratas en las jaulas con alimento y agua a demanda con administración oral del extracto como anteriormente durante 24 horas adicionales. A continuación, se sacrificaron las ratas y se realizó la autopsia para recoger sangre, hueso (tibia, fémur, vértebras L1-L4) y útero.
- 35
- 40

7.20. Densidad mineral ósea (BMD)

Se determinó la densidad mineral ósea de fémur (global, cabeza, cuello), tibia (global, cabeza, punto de separación tibio-fibular) y vértebra lumbar (LV1, LV2, LV3, LV4) por medio de DEXA.

45

8. Prevención de pérdida ósea inducida por Ovx por medio de C002

- Se midió BMD de huesos extirpados por medio de DEXA a los 90 días de tratamiento de ratas Ovx con extractos etanólicos (C002) de *Ulmus wallichiana* (750 mg/kg de peso corporal). Los datos revelaron que las ratas Ovx tratadas con extractos etanólicos a 750 mg/kg tienen un BMD significativamente más elevado en el fémur (global, cuello y región del eje) en comparación con los grupos Ovx tratados con un vehículo (Figura 2A, B, C). Además, las ratas Ovx tratadas con extractos etanólicos a 750 mg/kg tienen BMD significativamente más elevado en la vértebra LV4 (la vértebra que soporta el peso) en comparación con los grupos Ovx tratados con vehículo (Figura 2D). A partir de estos resultados, se concluye que C002 tiene una acción de conservación en condiciones de deficiencia de estrógenos. **Figura 2:** Extracto etanólico de *Ulmus wallichiana* reduce la pérdida ósea inducida por Ovx en ratas. Se midió BMD por medio de DEXA en huesos extirpados. Se compararon las ratas Ovx tratadas con 750 mg/kg de peso corporal C002 durante 90 días con Ovx y ratas de operación simulada tratadas con vehículo (control). (A) Fémur
- 50
- 55

global, (B) cuello de fémur, (C) eje de fémur y (D) cuarta vértebra lumbar (**-P<0,001, *-P<0,01, *-P<0,05 cuando se compara con BMD de simulación .a-<0,001, b-P<0,01, c-P<0,05 cuando se compara con BMD de control ovx).

9. Evaluación del efecto agonista estrogénico de C002

5 La ovariectomía tiene como resultado la reducción de peso uterino y los agentes con acción similar a estrógenos aumentan el peso uterino. Las ratas OvX tratadas con extractos etanólicos (C002) de *Ulmus wallichiana* (750 mg/kg de peso corporal) durante 90 días presentaron una reducción intensa de peso uterino en comparación con las ratas de operación simulada tratadas con vehículo que fue comparación con ratas OvX operadas con vehículo (Figura 3). Por tanto, se concluye que C002 no tiene acción agonista de estrógenos a nivel uterino.

10 **Figura 3:** El extracto etanólico de *Ulmus wallichiana* no es estrogénico en ratas a nivel uterino. Peso uterino de 750 mg/kg de peso corporal. Las ratas tratadas con C002 durante 90 días en comparación con ratas ovx y simulación de control. ***-P<0,001, **-P<0,01, *-P<0,05 cuando se compara con el peso uterino de ratas de control simulación: c-P<0,001; b-P<0,01; a-P<0,05 cuando se compara con el peso uterino de ratas ovx.

10. Obtención de PBM en ratas se Sprague Dawley

15 a) se tomaron ratas hembra de 21 días (en el destete) para estudiar los efectos de C002 en la obtención de PBM. Trascorridos 30 días de tratamiento con C002 a 750 mg/kg de peso corporal, se encontró que los valores de BMD fueron significativamente mayores en eje de fémur de ratas tratadas con C002 en comparación con el control (vehículo) (Figura 4A). C002 a 750 mg/kg de peso corporal también aumentó BMD de la cuarta vértebra lumbar en ratas inmaduras (Figura 4B). Los inventores concluyen que C002 mejora la obtención de PBM en ratas hembras en desarrollo.

20 b) se tomaron ratas hembra de 21 días (en el destete) para estudiar los efectos de la fracción de C002 (F004) en la obtención de PBM. Trascorridos 30 días de tratamiento con F004 a 50 mg/kg de peso corporal, se encontró que los valores de BMD fueron significativamente mayores en eje de fémur de ratas tratadas con F004 en comparación con el control (vehículo) (Figura 4A). Los inventores concluyen que F004, la fracción de C002, favorece la obtención de PBM en ratas hembras en desarrollo

25 **Figura 4:** El extracto etanólico y una fracción de *Ulmus wallichiana* favorece PMB en ratas inmaduras. Se midió BMD por medio de DEXA en huesos extirpados. Las ratas hembra en desarrollo tratadas con 750 mg/kg de C002 y 50 mg/kg de 914/F004 (una fracción) se compararon con ratas tratadas con el vehículo (control). (A) Eje de fémur y (B) cuarta vértebra lumbar (**-P< 0,001, **-P< 0,01, *-P< 0,05).

11. Estimulación de células osteoprogenitoras por medio de C002

35 Se evaluó el aumento de células osteoprogenitoras en médula ósea por medio de la actividad de ALP y mineralización de BMC tras el tratamiento con C002 en ratas en desarrollo, como se ha descrito con anterioridad. Se encontró que la actividad de ALP, una medida de la diferenciación de osteoblastos, fue significativamente mayor en BMC obtenido a partir de ratas tratadas con C002 en comparación con los controles (Figura 5 A). También, la mineralización de BMC a partir de ratas tratadas con C002 fue significativamente mayor que los controles (vehículo) (Figura 5 B & C). Los inventores concluyen que C002 mejora la obtención de PBM aumentando las células osteoprogenitoras en médula ósea. **Figura 5:** El extracto etanólico de *Ulmus wallichiana* favorece las células osteoprogenitoras en ratas inmaduras. Se compararon valores de BMC de ratas hembra en desarrollo tratadas con 750 mg/kg de C002 y 50 mg/kg de 914/C002 con ratas tratadas con vehículo (control). (A) Ensayo de fosfatasa alcalina (para diferenciación de osteoblastos), B) microfotografías de células teñidas con rojo-S de alizarina (para mineralización de osteoblastos) y (C) cuantificación de tinción de rojo-S de alizarina tras extracción (**-P< 0,001, **-P< 0,01, *-P< 0,05).

12. Estimulación de diferenciación de osteoblastos por medio de cuatro compuestos puros aislados a partir de F004

45 Se sometieron a ensayo cuatro compuestos puros, K012, K058, K068 y K100, aislados a partir de F004, en cuanto a su capacidad para estimular la diferenciación de osteoblastos. Los osteoblastos de bóveda craneal tratados con diversas concentraciones (0,1 nM a 1,0 μM) de estos cuatro compuestos exhibieron de 70 a 100 % de aumento de actividad de ALP en comparación con el control (vehículo) (Figura 6). Los inventores concluyen que los 4 compuestos puros aislados estimulan la diferenciación de osteoblastos lo que permite a éstos transportar su función formadora ósea y una importante función anabólica ósea.

50 **Figura 6:** Cuatro compuestos puros de *Ulmus wallichiana* favorecen la diferenciación de osteoblastos de la bóveda craneal in vitro. Se trataron los osteoblastos de la bóveda craneal con K012, K058, K068 y K100 a concentraciones de 1 y 100 nM y se cuantificó la producción de ALP. ***-P<0,001, **-P<0,01, *-P< 0,05; N= 3.

55

13. Estimulación de mineralización de osteoblastos de bóveda craneal por medio de cuatro compuestos puros aislados a partir de F004

Se sometió a ensayo la mineralización *in vitro* de matriz extracelular por medio de células de osteoblastos de bóveda craneal de ratas (hueso membranoso) mediante tinción con Alizarina & extracción y tinción de Von kossa. Con los 4 compuestos (concentraciones de 1 nM y 100 μ M) se apreció un aumento significativo de la mineralización (Figura 7). Se comprobó que la tinción de rojo de alizarina, una medición de la deposición de calcio naciente, aumentó en 10 a 25 % en osteoblastos tratados con K012, K058, K068 y K100, en comparación con el control (vehículo). (Figuras 7 A & B). También se comprobó que Von kossa que reacción con fosfato en estado ácido y no con calcio y es una medición de los nódulos mineralizados, aumentó en osteoblastos tratados con K012, K058, K068 y K100, en comparación con los controles (vehículo) (Figura 7 C). Los inventores concluyen que los 4 compuestos favorecen una cantidad de calcificación y formación de nódulo óseo mineralizado en osteoblastos procedentes de hueso membranoso (bóveda craneal), lo cual son importantes acciones anabólicas óseas.

Figura 7: Cuatro extractos puros de *Ulmus wallichiana* favorecen la mineralización *in vitro* de osteoblastos de la bóveda craneal. Se trataron los osteoblastos de la bóveda craneal con K012, K058, K068 y K100 a concentraciones de 1 y 100 nM. (A) Microfotografía de osteoblastos teñidos con rojo-S de alizarina. (B) Cuantificación de tinción de rojo-S de alizarina tras su extracción (**-P<0,001, *-P<0,01, *-P<0,05). (C) Microfotografía de osteoblastos teñidos por medio del método de von kossa.

14. Estimulación de la proliferación de osteoblastos de bóveda craneal por medio de K058

K058 de 10 nM a 1,0 μ M estimuló la incorporación de BrdU (una medida de la proliferación celular) de cultivos semi-confluentes de osteoblastos de bóveda craneal en 25 a 75 % (Figura 8). Los inventores concluyen que K058 ejerce un efecto mitogénico sobre los osteoblastos, lo cual es una importante acción anabólica ósea.

Figura 8: K058 favorece la proliferación de osteoblastos de la bóveda craneal. Se trataron los osteoblastos de la bóveda craneal con K058 a concentraciones de 1 y 100 nM y se llevó a cabo el ensayo de proliferación de células BrdU. ***-P<0,001, **-P<0,01, *-P<0,05; N = 3.

15. Estimulación de mineralización de BMC por medio de cuatro compuestos puros aislados a partir de F004

Los estudios han mostrado que fitoestrógeno y genisteína pueden mejorar el compromiso y la diferenciación de BMC hacia la génesis de osteoblastos (Heim et al., Endocrinology, 2004 Feb; 145(2): 848-59). El crecimiento óseo (modelado) y el mantenimiento (remodelado) tuvieron lugar en huesos cortical y trabecular, que contiene médula. Los inventores observaron que K012, K058, K068 y K100 estimularon la mineralización de osteoblastos de médula ósea a concentraciones de 1 nM y 100 nM tal y como se evaluó por medio del método de tinción de rojo de alizarina (Figura 9 A & B). Los inventores concluyen que los 4 componentes mejoran la mineralización de BMC, lo que se requiere para su acción osteogénica en el desarrollo y mantenimiento del esqueleto. **Figura 9:** Cuatro compuestos puros de *Ulmus wallichiana* favorecen la mineralización *in vitro* de BMC (células de médula ósea). Se trataron BMC con K012, K058, K068 y K100 a concentraciones de 1 y 100 nM y se llevó a cabo la mineralización. (A) Microfotografías de células teñidas con rojo-S de alizarina. (B) Cuantificación de tinción de rojo-S de alizarina tras su extracción (**-P<0,001, **-P<0,01, *-P<0,05).

16 A. Inhibición *in vitro* de adipogénesis en células 3T3 L1 por medio de K068 y K100

Un aspecto bien reconocido de la pérdida ósea pos-menopáusica e inducida por la edad es el aumento de la adipogénesis de médula ósea, ya que una mayor formación de adipocitos procedente de la combinación común de hemocitoblastos mesenquimales en médula ósea tiene como resultado la formación de menos osteoblastos. Por tanto, la inhibición de la diferenciación de adipocitos es un enfoque terapéutico principal para la osteoporosis. 3T3-L1 es un preadipocito múrido que se usó para estudiar los efectos de K068 y K100 en la diferenciación de adipocitos. Los datos muestran que K068 y K100 en concentraciones de 1 μ M, 100 nM y 1 nM inhibieron de forma significativa la diferenciación de adipocitos (Figura 10 A). Los inventores concluyen que K068 y K100 tienen un efecto anti-adipogénico.

16 B. Infra-regulación de niveles de ARNm de genes adipogénicos en 3T3-L1 por medio de K068 & K100

Se trataron células 3T3-L1 con K068 y K100 en concentraciones de 10^{-7} & 10^{-9} M durante 8 días (tiempo de la formación de adipocitos). RT-PCR semi-cuantitativo reveló menores niveles de ARNm de PPAR- γ y adiponectina (Figura 10 B). Los inventores concluyen que K068 & K100 ejercen acción anti-adipogénica por medio de la infra-regulación de diversos genes que favorecen la diferenciación de adipocitos.

Figura 10: K068 y K100 inhiben la diferenciación adipogénica de preadipocitos múridos 3T3-L1. (A) Se trataron células 3T3-L1 con K068 y K100 a concentraciones de 1 μ M, 100 nM y 1 nM y se llevó a cabo la tinción de rojo-O de aceite. Se sometió a extracción la tinción y se cuantificó. ***-P<0,001, **-P<0,01, *-P<0,05; N = 3. (B) PCR RT semi-cuantitativo de diversos genes específicos de diferenciación de adipocitos tras el tratamiento de células de preadipocito 3T3-L1 con 100 nM y 1nM de K068 y K100 durante 8 días (tiempo de diferenciación de adipocitos). Se usó GAPDH como control de carga de ARN. Dibujo de gel representativo de los tres experimentos independientes con

resultados similares.

Tabla 3: Sumario de los efectos in vitro de los compuestos puros aislados a partir de *Ulmus wallichiana*

K058 – Proliferación, diferenciación y mineralización de osteoblastos favorecidas.
K012 – Diferenciación y mineralización de osteoblastos favorecidas.
K068 – Diferenciación y mineralización de osteoblastos favorecidas y tiene actividad anti-adipogénica en estirpe celular 3T3 L1.
K100 – Diferenciación y mineralización de osteoblastos favorecidas y tienen actividad anti-adipogénica en estirpe celular 3T3 L1.

17. Sobre-regulación de niveles de ARNm de genes osteogénicos en osteoblastos por medio de K058

5 Se sometieron a ensayo osteoblastos de bóveda craneal con K058 a una concentración de 10^{-7} M de 0 a 48 horas. RT-PCR semi-cuantitativo reveló niveles de ARNm de colágeno I (COL-1), factor-1 de enlace de núcleo (Cbfa-1), fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OCN) y proteína-2 morfogénica ósea (BMP-2) más elevados (Figura 11). Osteoprotegrina (OPG), la citoquina anti-osteoclastogénica más potente, se segregó a partir de los osteoblastos. K058 a 10^{-7} M aumentó los niveles de ARNm de OPG en osteoblastos de bóveda craneal (Figura 11). Los inventores
10 concluyen que K058 ejerce acción osteogénica por medio de sobre-regulación de la síntesis de diversos genes que favorecen las funciones de los osteoblastos e inhibiendo la función de osteoclastos.

Figura 11: K058 aumenta los niveles de ARNm de diversos genes específicos de osteoblasto. PCR RT semi-cuantitativo de diversos ARNm de osteoblasto tras el tratamiento de osteoblastos de bóveda craneal con 100 nM de K058 en diversos instantes de tiempo. Se usó GAPDH como control de carga interno. Dibujo de gel representativo de los tres experimentos independientes con resultados similares.
15

18. Perfiles estrogénico y no anti-estrogénico in vitro de K012 y K058

Las células de Ishikawa son células cancerígenas de endometrio humano que expresan niveles elevados de receptores de estrógenos y responden a estrógenos por medio del aumento de los niveles de ALP. Las células de Ishikawa tratadas con concentraciones crecientes de K012 y K058 (10^{-11} a 10^{-6} M) no exhibieron aumento alguno de los niveles de ALP mientras que 10^{-8} M de 17β -estradiol estimuló la actividad de ALP en aproximadamente 25,0 veces con respecto a los controles (células tratadas con vehículo) (Figura 12 A). Además, K012 y K058 en concentraciones que variaron de 10^{-11} a 10^{-6} M no inhibieron el aumento de la actividad de ALP estimulado por 17β -estradiol (Figura 12 B). Los inventores concluyen que K012 y K058 no poseen acciones agonistas de estrógenos o anti-estrogénicas.
20

Figura 12: K058 y K012 no poseen carácter estrogénico y anti-estrogénico in vitro. Las células de Ishikawa tratadas con 17β -estradiol estimulan la producción de ALP. (A) Aumento considerable de ALP con 10^{-8} M de 17β -estradiol en comparación con el control. K058, K012 y raloxifeno a diversas concentraciones no presentan respuesta alguna. (B) Niveles de ALP con diversas concentraciones de K012, K058 y raloxifeno en presencia de 17β -estradiol 10^{-8} M.
25

19. K058 reduce la pérdida ósea inducida por Ovx

30 Se midió BMD de huesos extirpados por medio de DEXA a los 90 días de tratamiento de ratas Ovx con K058 (1,0-5,0 mg/kg de peso corporal). Los datos revelaron que las ratas Ovx tratadas con 1,0-5,0 mg/kg tienen un BMD en fémur (global, cuello y eje) significativamente mayor que con el grupo Ovx tratado con vehículo (Figura 13 A, B & C). K058 a una dosis de 1,0&5,0 mg/kg de peso corporal también exhibió BMD más elevado en la vértebra L4 que soporta el peso (Figura 13 D) y BMD más elevado en cabeza de tibia a 5 mg/kg de peso corporal en comparación con el grupo Ovx tratado con el vehículo (Figura 13 E). A partir de estos resultados, se concluye que K058 tiene
35 acción de conservación ósea en condiciones de deficiencia de estrógenos.

Figura 13: K058 reduce la pérdida ósea inducida por Ovx en ratas. Se midió BMD por medio de DEXA en huesos extirpados. Se compararon ratas Ovx tratadas con 1,0&5,0 mg /kg de K058 durante 90 días con ratas operadas Ovx y de operación simulada tratadas con vehículo (control). (A) Fémur global, (B) cuello de fémur, (C) eje del fémur, (D) cuarta vértebra lumbar y (E) cabeza tibial (**-P<0,001, *-P<0,01, *P-<0,05 cuando se compara con BMD de simulación. a-P<0,001, b- P<0,01, c- P<0,05 cuando se compara con BMD de control de Ovx).
40

20. Perfil agonista de estrógenos in vivo de K058

La ovariectomía tiene como resultado una reducción del peso uterino y los agentes con acción parecida a estrógenos aumentan el peso uterino. Las ratas Ovx tratadas con K058 (1,0&5,0 mg/kg de peso corporal) durante 90 días presentaron una reducción intensa del peso uterino en comparación con ratas de operación simulada tratadas con vehículo que fue comparable con las ratas Ovx tratadas con vehículo (Figura 14).
45

Figura 14: K058 no es estrogénico en ratas a nivel uterino. Se comparó el peso uterino de ratas tratadas con 1,0&5,0 mg/kg de peso corporal de K058 durante 90 días con el peso uterino de ratas ovx y simulación de control. ***-P<0,001, **-P<0,01, *-P<0,05 cuando se compara con el peso uterino de ratas de control simulación, c- P<0,001, b- P<0,01, a- P<0,05 cuando se compara con el peso uterino de ratas ovx.

5 **21. Obtención de masa ósea máxima en ratas inmaduras por medio de K058**

Se tomaron ratas hembra de 21 días (en el destete) para estudiar los efectos de K058 en la obtención de PBM. Trascurridos 30 días de tratamiento con K058 a 5 mg/kg de peso corporal, se encontró que los valores BMD fueron significativamente más elevados en la región del eje del fémur en comparación con el control (vehículo) (Figura 15). Los inventores concluyen que K058 mejora la obtención de PBM en ratas hembras en desarrollo

10 **Figura 15:** K058 favorece PBM en ratas inmaduras. Se midió BMD por medio de DEXA en huesos extirpados. Se compararon ratas hembra en crecimiento con 5 mg/kg de K058 con ratas tratadas con el vehículo (control). Se muestra BMD en eje de fémur (***-P<0,001, **-P<0,01, *-P<0,05).

22. Estimulación de células osteoprogenitoras por medio de K058

15 Se evaluó el aumento de células osteoprogenitoras en médula ósea por medio de la actividad de ALP y la mineralización de BMC tras el tratamiento de K058 (5,0 mg/kg de peso corporal) en ratas en crecimiento, como se ha descrito con anterioridad. Se comprobó que la actividad de APL, una medida de la diferenciación de osteoblastos, fue mayor en BMC obtenidos a partir de ratas tratadas con K058 (5,0 mg/kg de peso corporal) en comparación con los controles (Figura 16 A). También, la mineralización de BMC procedente de ratas tratadas con K058 fue significativamente mayor que en los controles (vehículo) (Figura 16 B & C). Los inventores concluyen que K058
20 mejora la obtención de PMB aumentando las células osteoprogenitoras en médula ósea.

Figura 16: K058 favorece las células osteoprogenitoras en ratas inmaduras. Se compararon BMC de ratas hembra en crecimiento tratadas con 5 mg/kg de K058 durante 30 días con ratas tratadas con el vehículo (control). (A) Ensayo de fosfatasa alcalina, (B) Microfotografías de células teñidas con rojo-S de alizarina y (C) cuantificación de la tinción de rojo-S de alizarina tras la extracción (***-P<0,001, **-P<0,01, *-P<0,05).

25 **23. K012 reduce la pérdida ósea inducida por Ovx**

Se midieron BMD de huesos extirpados por medio de DEXA a 90 días de tratamiento de ratas Ovx con K012 (1,0-5,0 mg/kg de peso corporal). Los datos revelaron que las ratas Ovx tratadas con 5,0 mg/kg tuvieron un BMD significativamente más elevado en cuello de fémur, tibia global, cabeza de tibia y punto de separación tibio-fibular (TFSP) en comparación con el grupo Ovx tratado con vehículo (Figura 17 A, B, C & D). K012 a una dosis de
30 5,0 mg/kg de peso corporal también exhibió un BMD más elevado en el global y la segunda vértebra lumbar (Figura 17 E & F) en comparación con el grupo Ovx tratado con vehículo. También se observó un aumento de BMD en TFSP en ratas tratadas con K012 a 1,0 mg/kg de peso corporal (Figura 17 D) cuando se compara con el grupo Ovx tratado con vehículo. A partir de estos resultados, se concluye que K012 tiene una acción de conservación en condiciones de deficiencia estrogénica.

35 **Figura 17:** K012 reduce la pérdida ósea inducida por Ovx en ratas. Se midió BMD por medio de DEXA en huesos extirpados. Se compararon ratas Ovx tratadas con 1,0&5,0 mg/kg de K012 durante 90 días con ratas de operación simulada y Ovx tratadas con el vehículo (control). (A) cuello de fémur, (B) tibia global, (C) cabeza tibial, (D) punto de separación tibio-fibular, (E) vértebra lumbar global y (F) segunda vértebra lumbar (***-P<0,001, *-P<0,01, *-P<0,05 cuando se compara con BMD de simulación. a- P<0,001, b- P<0,01, c- P<0,05 cuando se compara con BMD de control ovx).
40

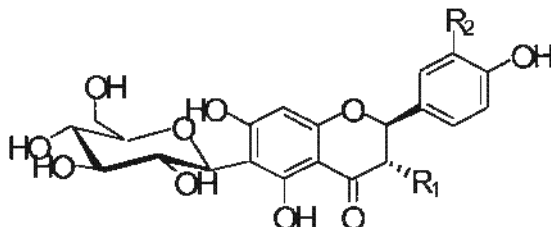
24. Perfil agonista de estrógenos in vivo de K012

La ovariectomía tiene como resultado la reducción del peso uterino y los agentes con acción similar a estrógenos aumentan el peso uterino. Las ratas Ovx tratadas con K012 (1,0&5,0 mg/kg de peso corporal) durante 90 días tuvieron una reducción intensa del peso uterino en comparación con ratas de operación simulada tratadas con
45 vehículo que fue comparable con ratas Ovx tratadas con vehículo (Figura 18). Por tanto, se concluye que K012 no tiene acción agonista de estrógenos a nivel uterino.

Figura 18: K012 no es estrogénico en ratas a nivel uterino. Se comparó el peso uterino de ratas tratadas con 1,0&5,0 mg/kg de peso corporal de K012 durante 90 días con el peso uterino de ratas de simulación de control y ovx. (***-P<0,001, **-P<0,01, *-P<0,05 cuando se compara con el peso uterino de ratas de control simulación, c-
50 P<0,001, b- P<0,01 y a- P<0,05 cuando se compara con el peso uterino de ratas de ovx).

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de flavonol de fórmula general 1 en la que R1 es OH y R2 es OH o H.



K058: R₁=R₂=OH

K100: R₁=OH, R₂=H

Fórmula General 1

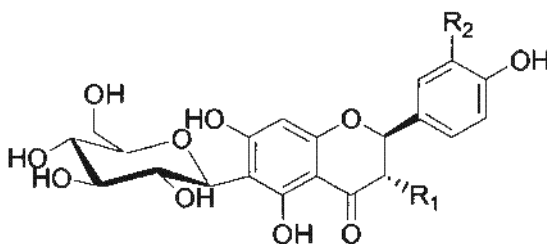
5

2. Un compuesto según la reivindicación 1 aislado a partir de *Ulmus wallichiana*.

3. Un compuesto según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de trastornos óseos.

10

4. Un extracto/fracción bioactiva de *Ulmus wallichiana* útil para la gestión o prevención o tratamiento de trastornos óseos en el que dicho extracto/fracción comprende compuestos marcadores de fórmula general 2,



K058: R₁=R₂=OH

K012: R₁=R₂=OH, 2,3 doble enlace

K068: R₁=R₂=H

K100: R₁=OH, R₂=H

Fórmula General 2

15

en la que los compuestos marcadores K012, K058, K068, K100 varían de 6,7-12 %, 1,7-4,5 %, 0,6-1,2 %, 1,7-4,5 % respectivamente en extracto alcohólico.

20 5. Un extracto bioactivo según la reivindicación 4 en el que el extracto se obtiene a partir de extracción alcohólica de *Ulmus wallichiana* que comprende los compuestos marcadores K012 (6,7-9 %), K058 (3,3-4,5 %), K068 (0,6-0,7 %), K100 (1,7-2,6 %).

25 6. Una fracción bioactiva según la reivindicación 4 en la que la fracción soluble en acetona obtenida a partir del extracto alcohólico comprende los compuestos marcadores K012 (7,9-12 %), K058 (1,7-3,0 %), K068 (0,7-1,2 %) y K100 (2,5-4,5 %).

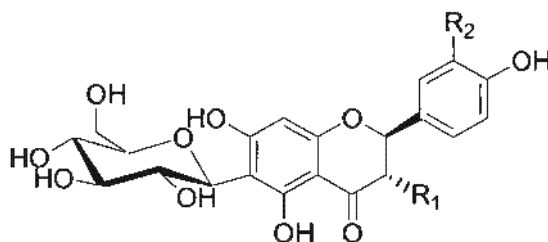
30 7. Una fracción bioactiva según la reivindicación 4, en la que la fracción alcohólica/fracción soluble en acetona tiene una acción de conservación ósea en condiciones de deficiencia de estrógenos.

8. Una fracción bioactiva según la reivindicación 4, en la que la fracción alcohólica mejora la obtención de PBM aumentando las células osteoprogenitoras en la médula ósea.

9. Una fracción bioactiva según la reivindicación 4, en la que el extracto/fracción bioactiva se obtiene a partir de partes de plantas seleccionadas entre corteza de tallo, ramitas de *Ulmus wallichiana*.

10. Un compuesto de fórmula general 1 según la reivindicación 1 y un extracto/fracción bioactiva o sus compuestos marcadores según la reivindicación 4, obtenido a partir de *Ulmus wallichiana*, individualmente o en forma de una de sus combinaciones, para su uso en la gestión o prevención o tratamiento de un trastorno óseo.

11. El extracto/fracción bioactiva para su uso según la reivindicación 10, en el que la dosis eficaz del extracto alcohólico varía entre 500-750 mg/kg y la fracción soluble en acetona varía entre 25 mg/kg y 100 mg/kg.



K058: $R_1=R_2=OH$
K012: $R_1=R_2=OH$, 2,3 doble enlace
K068: $R_1=R_2=H$
K100: $R_1=OH$, $R_2=H$

Fórmula General 2

12. Los compuestos para su uso según la reivindicación 10, en los que los compuestos de fórmula 2, K012, K058, K068, K100 exhiben de 70 a 100 % de aumento de actividad de ALP en comparación con el control (vehículo) en osteoblastos de bóveda craneal tratados a una concentración que varía de 0,1 nM a 1,0 μ M.

13. Los compuestos para su uso según la reivindicación 10, en los que los compuestos de fórmula 2 aumentan la deposición de calcio naciente de 10 a 25 % en osteoblastos tratados con K012, K058, K068 y K100, en comparación con el control (vehículo).

14. Los compuestos para su uso según la reivindicación 10, en los que los compuestos de fórmula 2 mejoran la mineralización de BMC, lo cual se requiere para su acción osteogénica en el crecimiento y mantenimiento del esqueleto.

15. Los compuestos para su uso según la reivindicación 10, en los que los compuestos de fórmula 2 se usan en combinación en proporciones que varían entre 0,25-1,0 (K068): 1,0-5,0 (K100): 2,5-7,5 (K058): 5,0-12,5 (K012).

16. Los compuestos para su uso según la reivindicación 10, en los que los compuestos de fórmula 2, K012, K058, favorecen la proliferación, diferenciación y mineralización de osteoblastos.

17. Los compuestos para su uso según la reivindicación 10, en los que los compuestos de fórmula 2, K068 y K100 favorecen la diferenciación y mineralización de osteoblastos y tienen una actividad anti-adipogénica en estirpe celular 3T3 L1.

18. Los compuestos para su uso según la reivindicación 10, en los que los compuestos de fórmula 1, K058 ejerce acción osteogénica por medio de la sobre-regulación de la síntesis de diversos genes seleccionados entre el grupo COL-1, Cbfa-1, ALP, OCN, BMP-2 que favorecen las funciones de osteoblastos e inhiben la función de osteoclastos.

19. Los compuestos según la reivindicación 10, en los que los compuestos de fórmula 1, K058 estimulan la incorporación de BrdU de cultivos semi-confluentes de osteoblastos de bóveda craneal de 25 a 75 % a una concentración que varía de 10 nM a 1,0 μ M.

20. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de extracto/fracción bioactiva según la reivindicación 4, opcionalmente junto con uno o más aditivos, vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables.

21. Una composición según la reivindicación 20, en la que la composición comprende: un compuesto seleccionado entre un grupo que consiste en K058 o K100 representado por medio de la fórmula general 1 individualmente, opcionalmente junto con uno o más aditivos, vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables.

22.Una composición farmacéutica según la reivindicación 20, en la que los diluyentes usados están seleccionados entre un grupo que consiste en almidón, lactosa y fosfato de dicalcio.

23.Una composición farmacéutica según la reivindicación 20, en la que el aditivo farmacéuticamente aceptable en forma de lubricante está seleccionado entre un grupo que comprende talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o esterotos, polietilen glicoles sólidos, lauril sulfato de sodio o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo o en una combinación apropiada.

24.Una composición farmacéutica según la reivindicación 20, en la que es administrada una dosis de dicha composición a una dosis unitaria de 500 a 750 mg/kg de peso corporal para el extracto alcohólico y de 25 a 100 mg/kg de peso corporal para la fracción soluble en acetona.

25.Una composición farmacéutica según la reivindicación 20, en la que un extracto alcohólico (C002) procede de *Ulmus wallichiana* que tiene acción de conservación ósea en condiciones de deficiencia de estrógenos, que no tiene acción antagonista de estrógenos a nivel uterino, mejora la obtención de PBM aumentando las células osteoprogenitoras en médula ósea en ratas hembras en desarrollo.

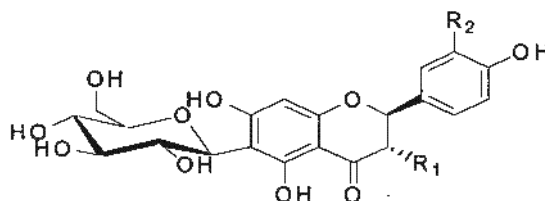
26. Un procedimiento de preparación del extracto/fracción y los compuestos de fórmula 1 de *Ulmus wallichiana*, en el que el procedimiento comprende:

- (a) proporcionar la planta *Ulmus wallichiana*,
- (b) pulverizar el material de la planta,
- (c) extraer el material vegetal en forma de polvo con disolvente prótico a temperatura ambiente,
- (d) filtrar el extracto,
- (e) concentrar el extracto a presión reducida,
- (f) triturar el extracto con hexano para retirar los constituyentes no polares,
- (g) secar el residuo a vacío para obtener un polvo que fluye libremente para proporcionar el extracto deseado,
- (h) disolver el extracto obtenido en la etapa (g) en agua,
- (i) precipitar el extracto acuoso por medio de adición de n-butanol,
- (j) filtrar el precipitado blanco para obtener el compuesto K058,
- (k) cristalizar el compuesto de la etapa (j) con la mezcla de metanol y acetato de etilo,
- (l) filtrar el compuesto cristalizado,
- (m) secar el compuesto para obtener K058 en forma de polvo blanco que fluye libremente,
- (n) concentrar el filtrado obtenido en la etapa (l) y triturar con acetona para obtener una fracción soluble en acetona,
- (o) aislar los compuestos K012, K068, K100 a partir de la fracción soluble en acetona de la etapa (n) por medio de métodos cromatográficos convencionales.

27.Un procedimiento según la reivindicación 26, en el que el alcohol usado para la extracción está seleccionado entre el grupo que consiste en metanol, etanol, propanol o una combinación apropiada de los mismos.

28.Un procedimiento según la reivindicación 26, en el que los disolventes usados para la trituración están seleccionados entre acetona, etil metil cetona, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, metanol o una combinación apropiada de los mismos.

29.Un compuesto de fórmula general K012 o K068 para su uso en el tratamiento de trastornos óseos.



K012: $R_1=R_2=OH$, 2,3 doble enlace
K068: $R_1=R_2=H$

30. Un compuesto para su uso según la reivindicación 29, en el que el compuesto estimula la diferenciación de osteoblastos.

Diagrama de Flujo: Extracción, Fraccionamiento y Aislamiento

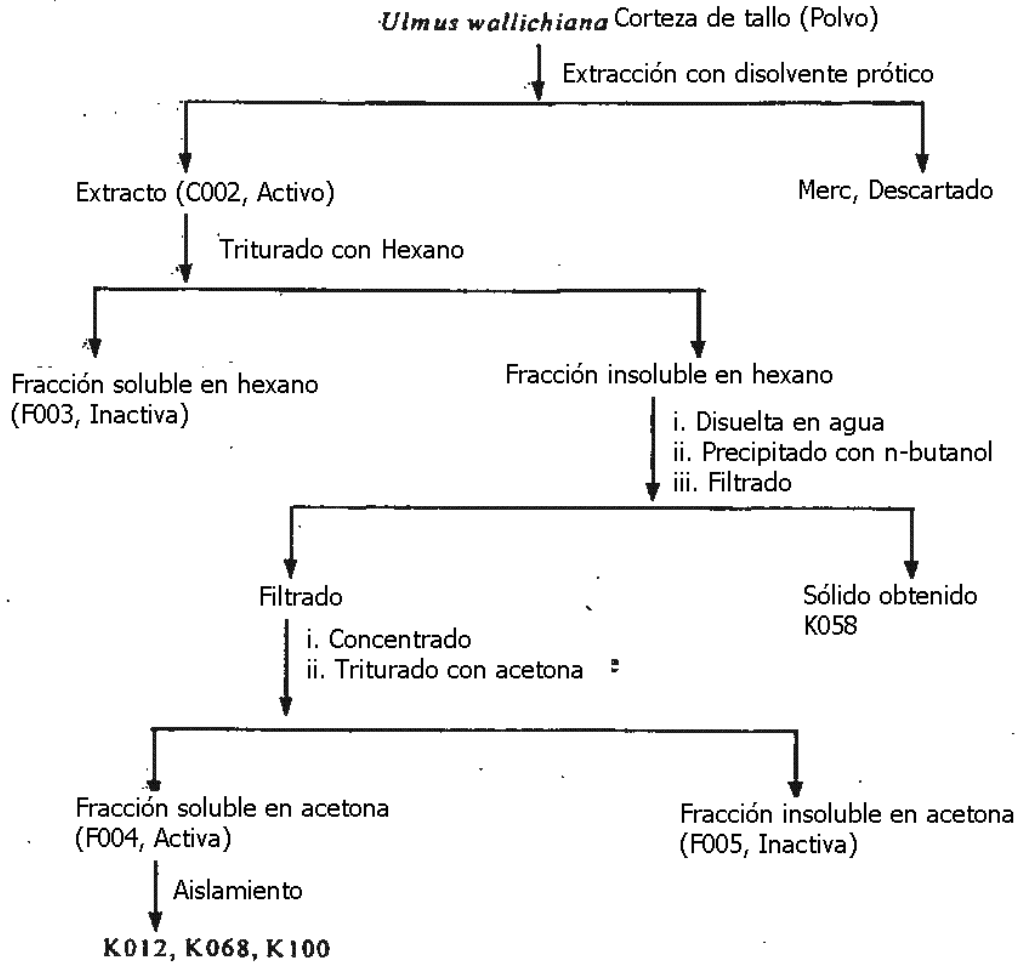


Fig 1

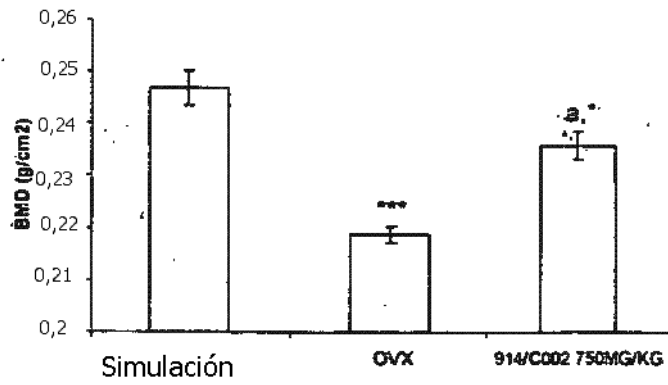


Fig 2A

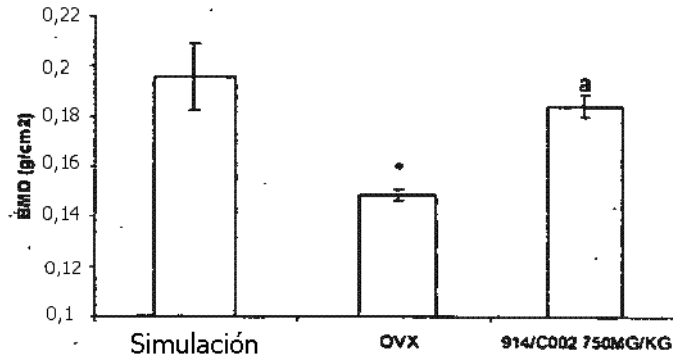


Fig 2B

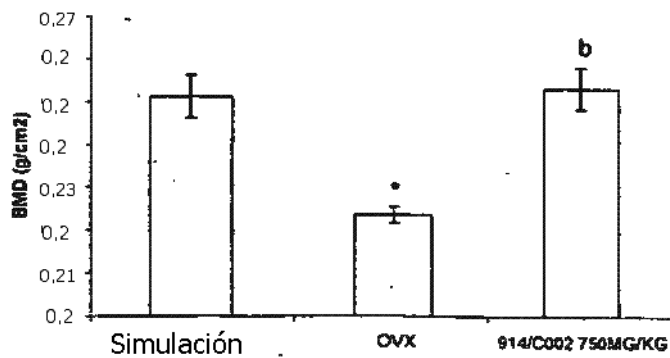


Fig 2C

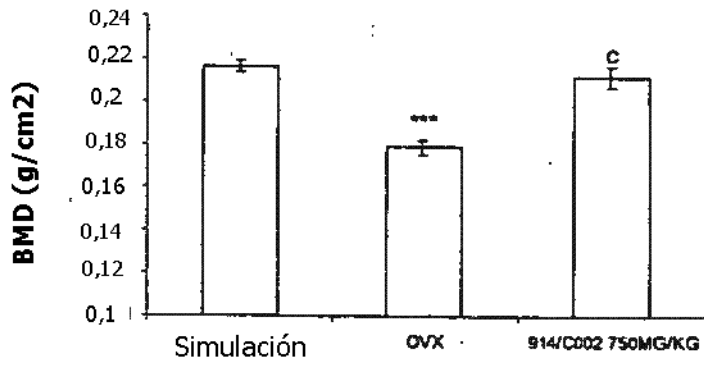


Fig 2D

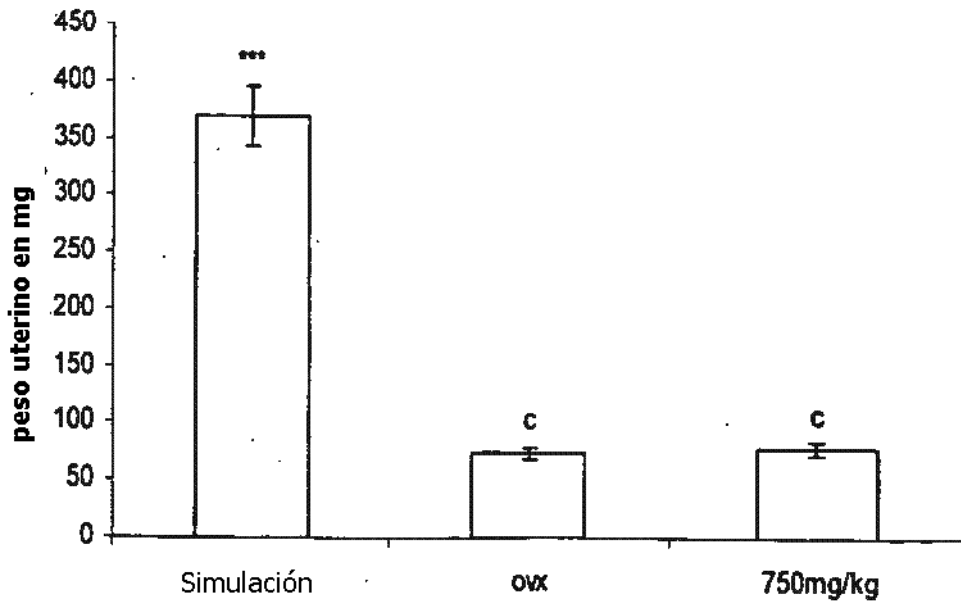


Fig. 3

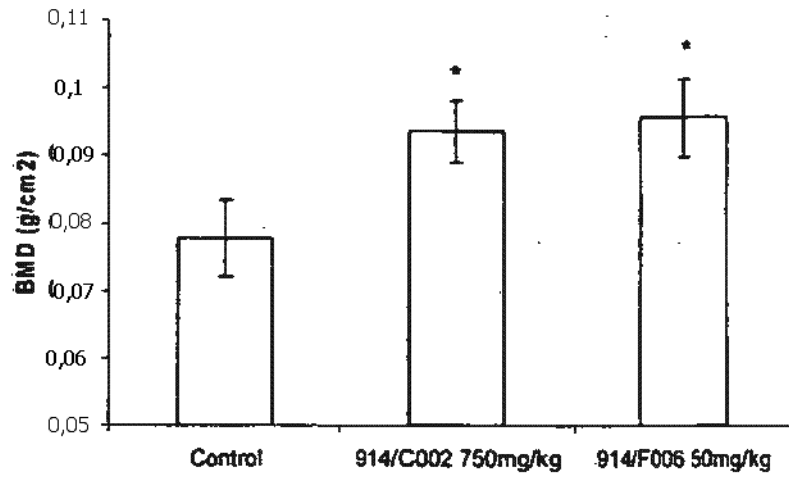


Fig 4 A

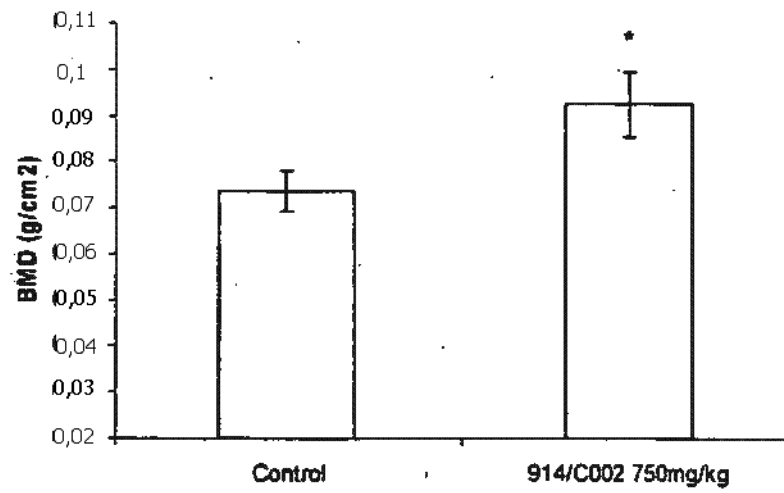


Fig 4 B

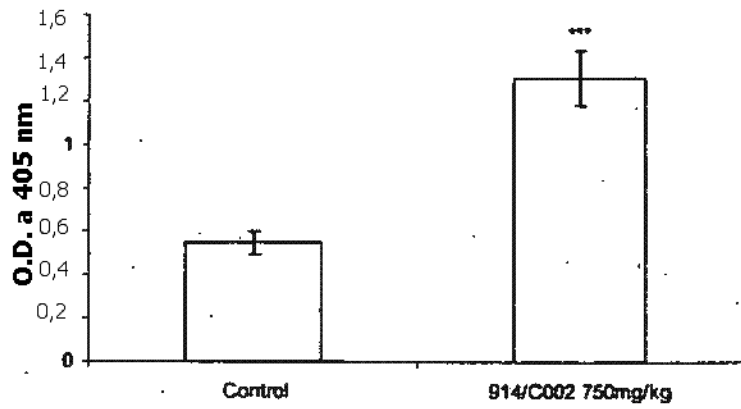


Fig 5 A

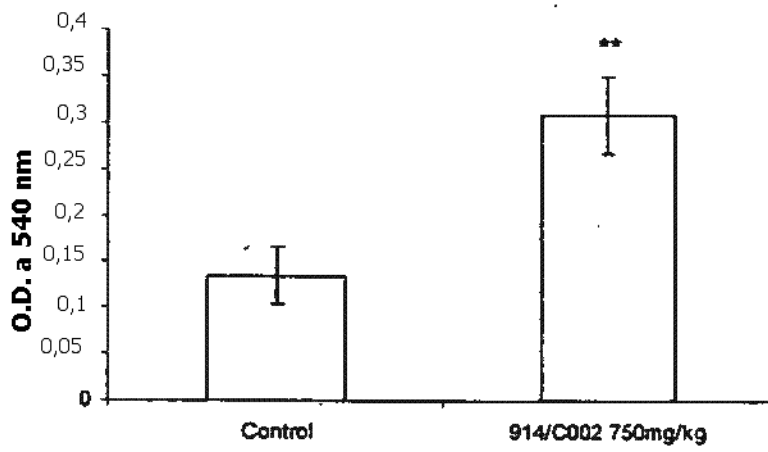


Fig 5 B

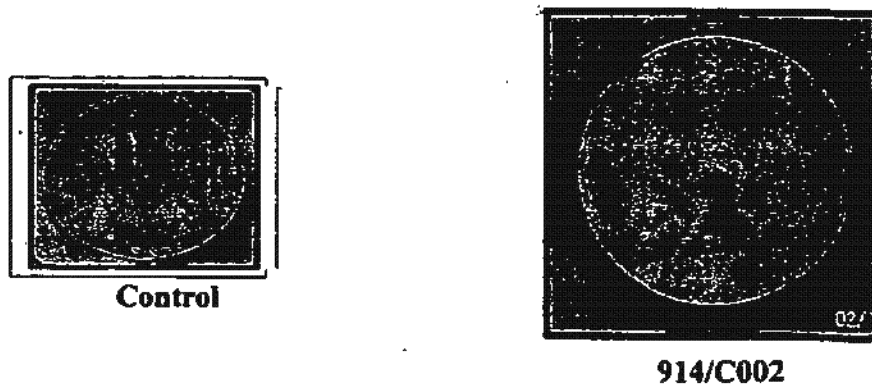


Fig 5 C

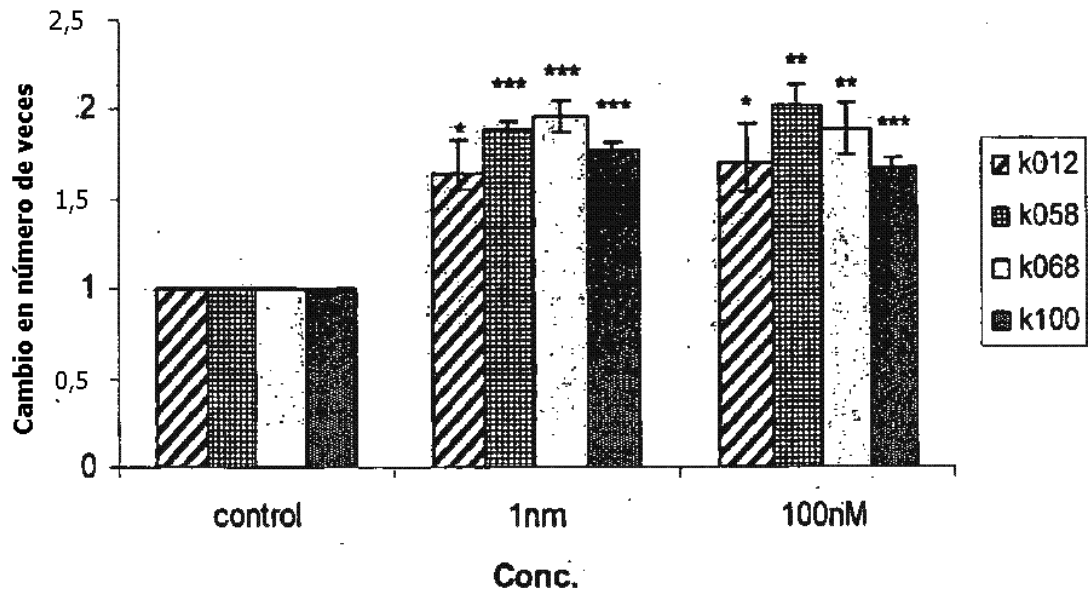


Fig 6

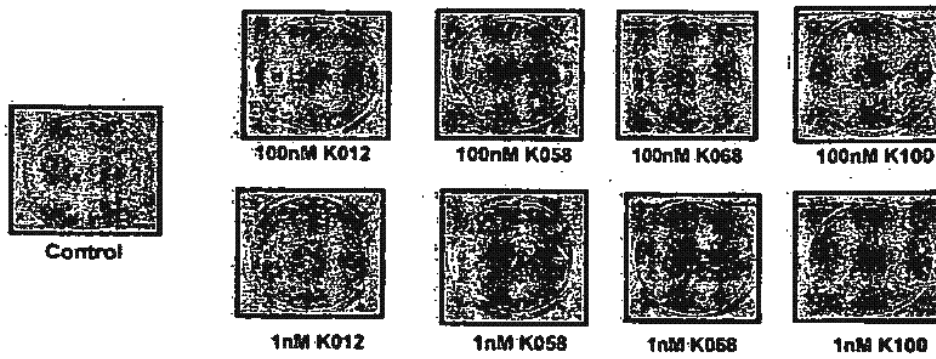


Fig 7A

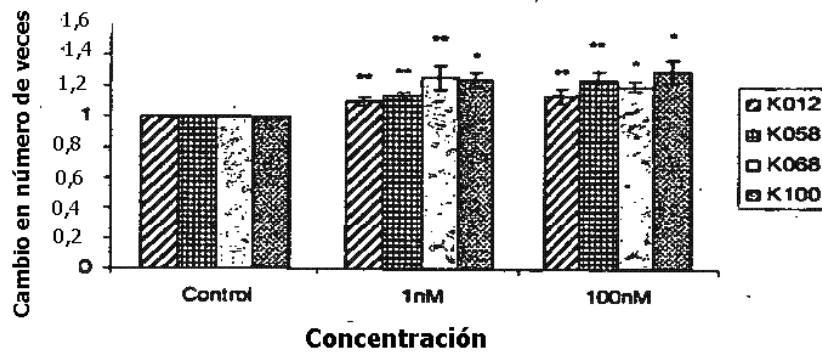


Fig 7B

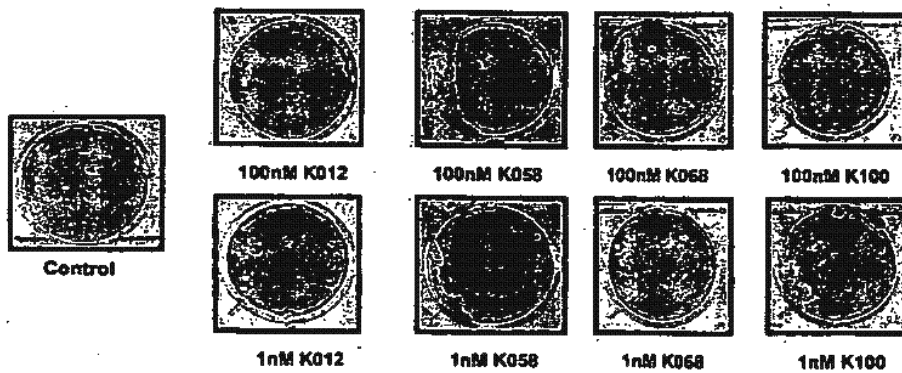


Fig 7C

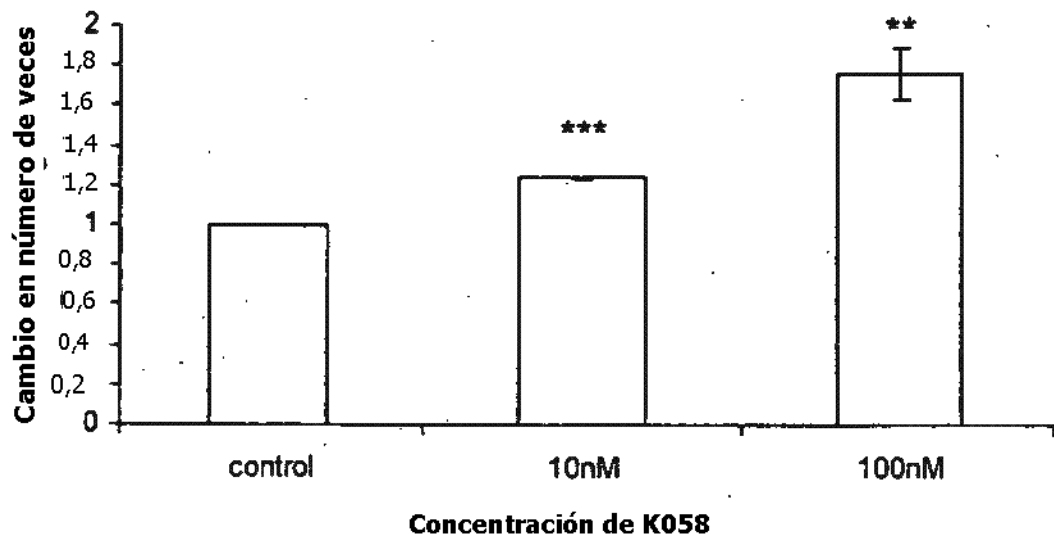


Fig 8

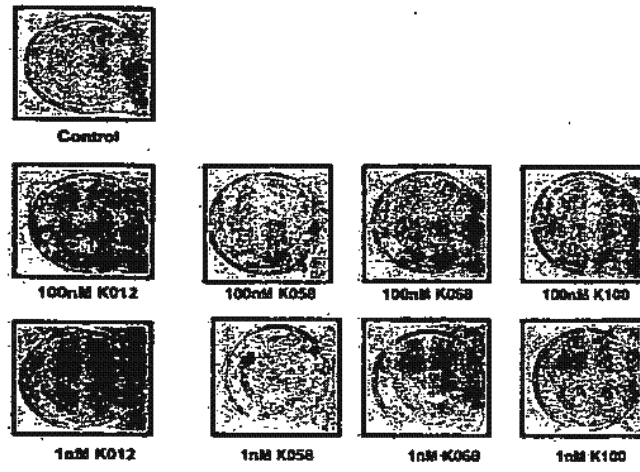


Fig 9 A

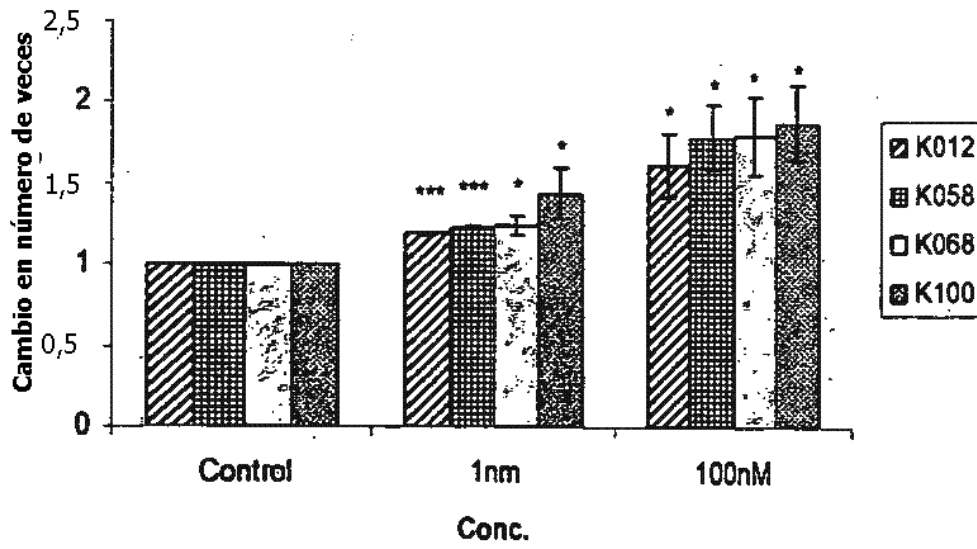


Fig 9 B

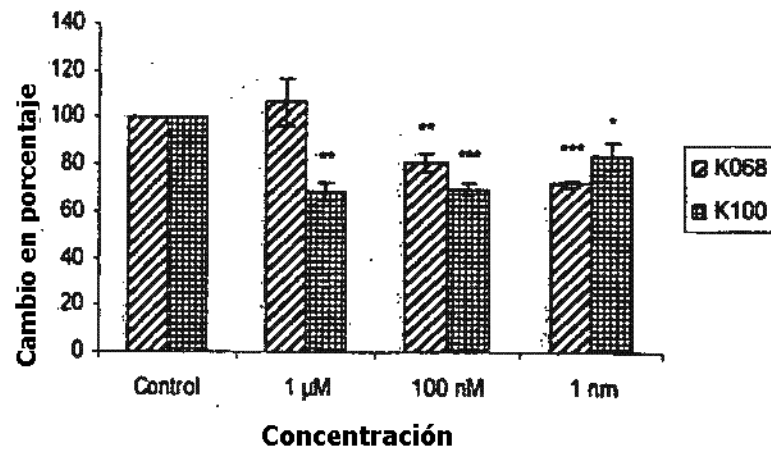


Fig 10 A

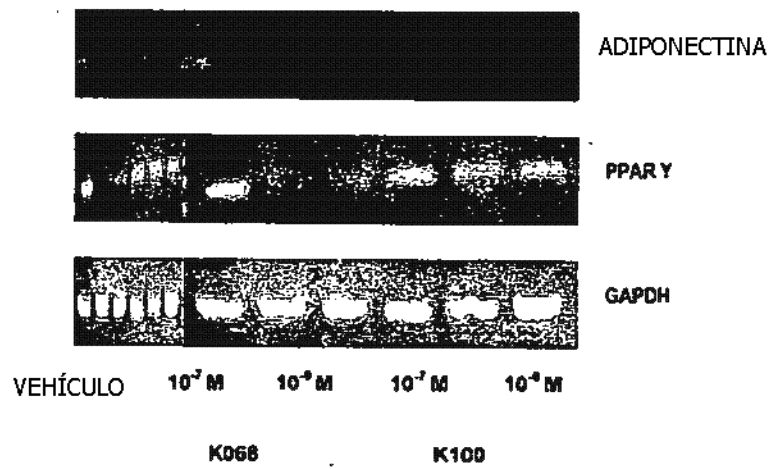


Fig 10 B

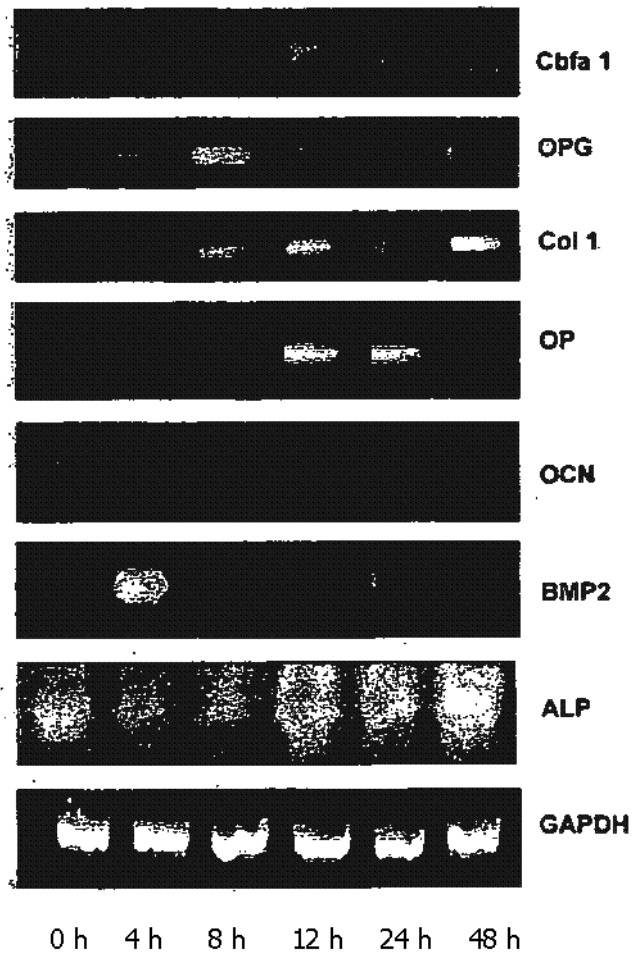


Fig. 11

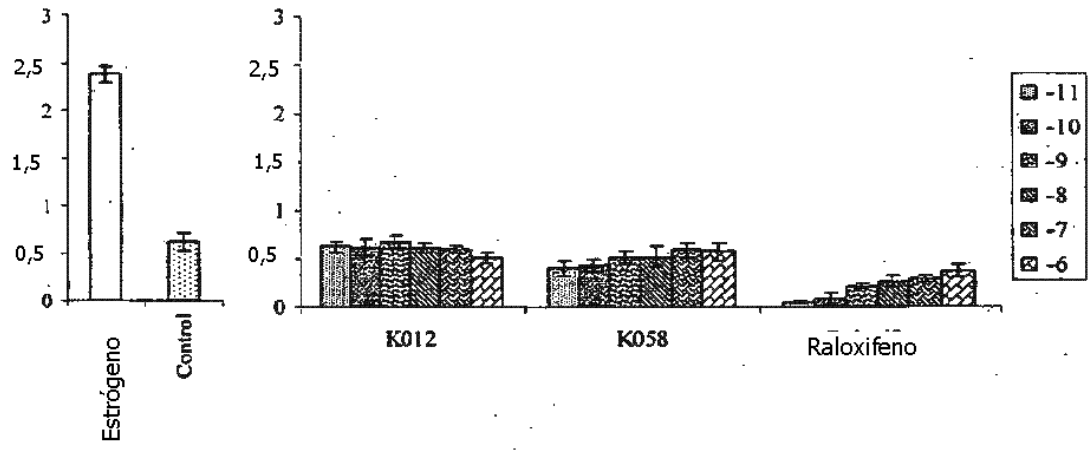


Fig 12 A

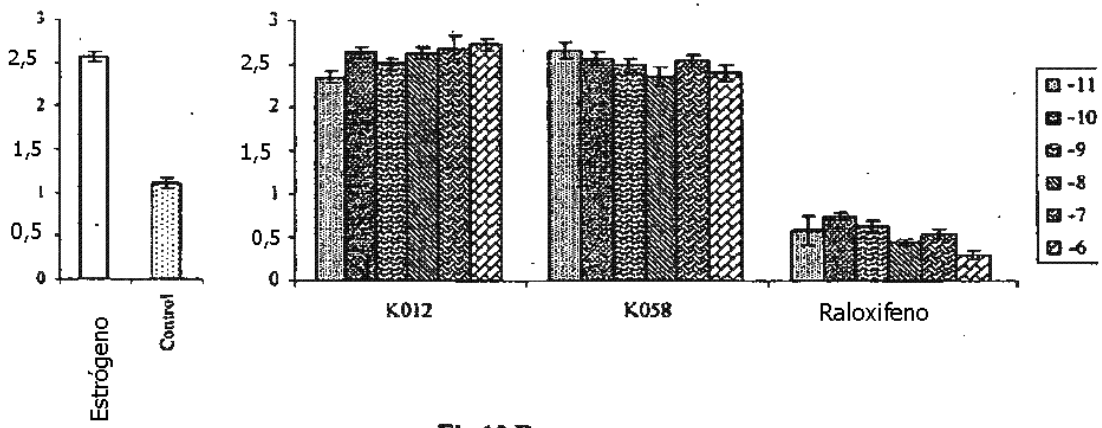


Fig 12 B

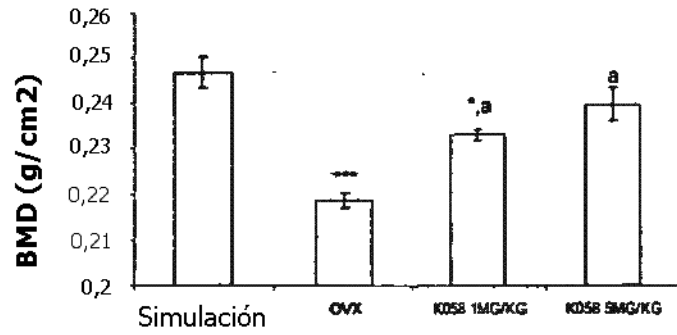


Fig 13 A

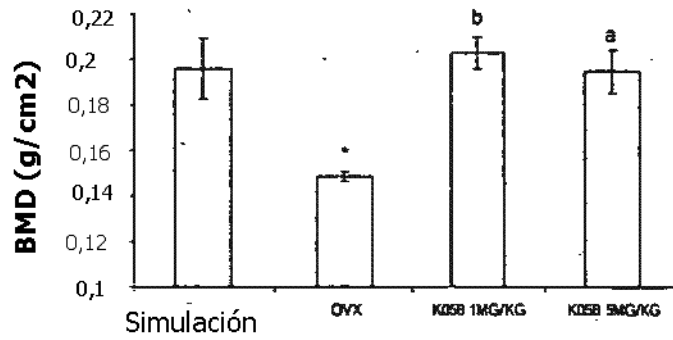


Fig 13 B

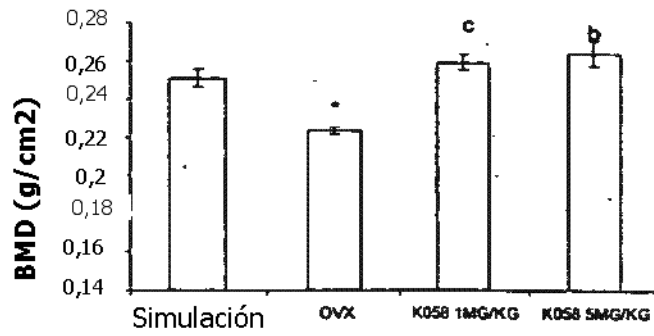


Fig 13 C

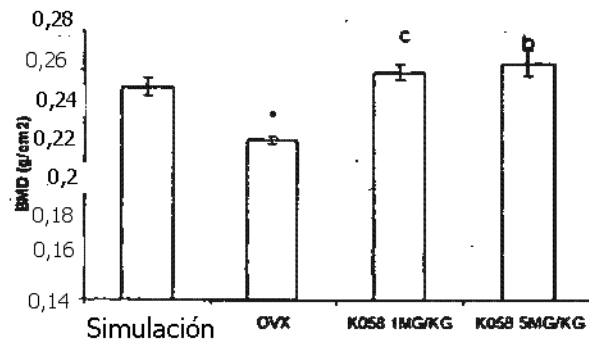


Fig 13 D

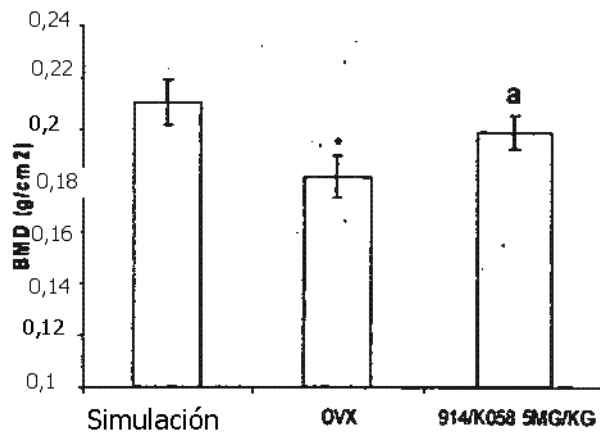


Fig 13 E

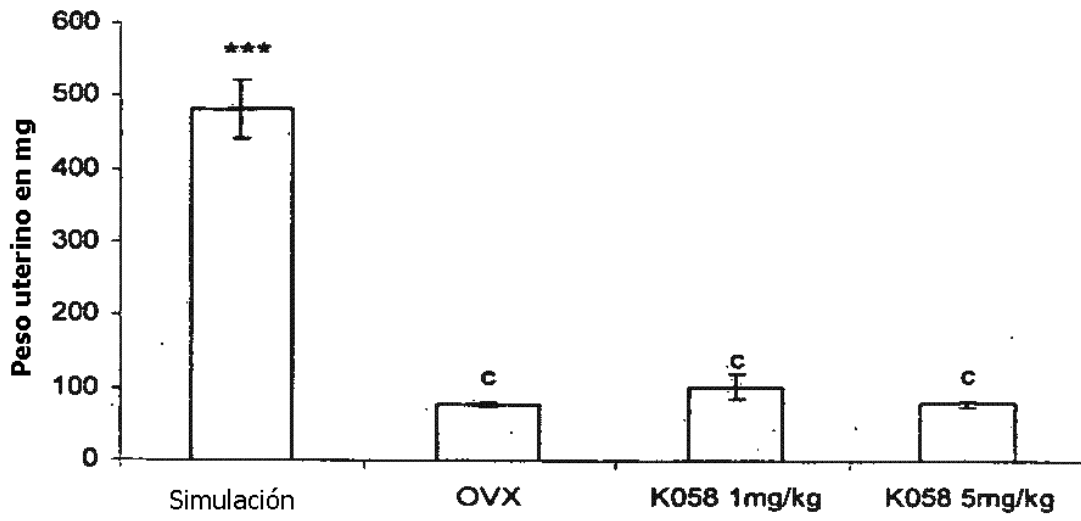


Fig 14

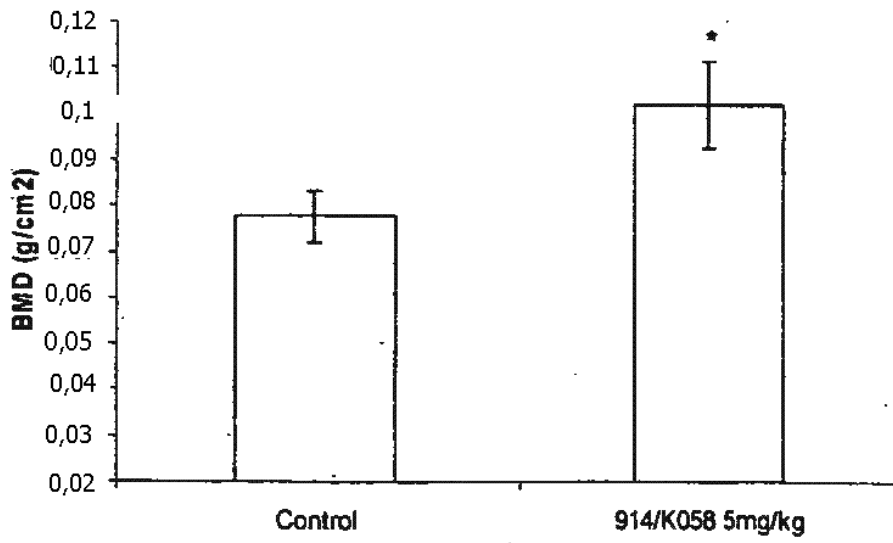


Fig 15

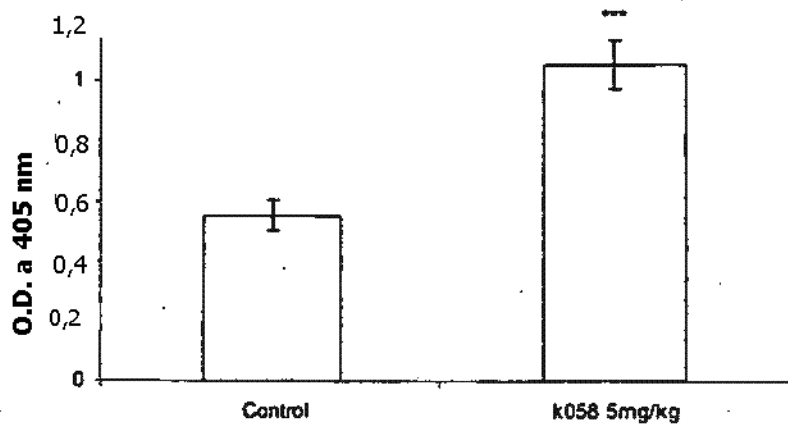


Fig 16 A.

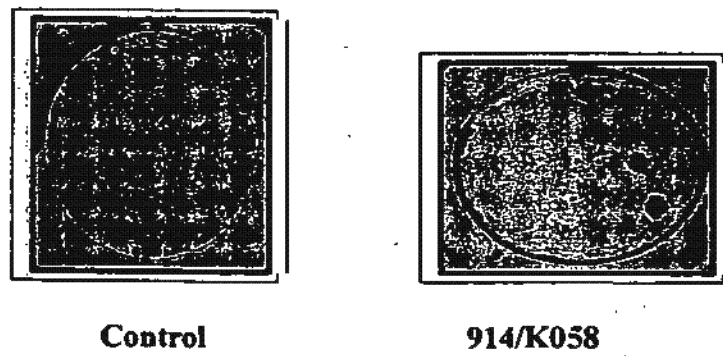


Fig 16 B

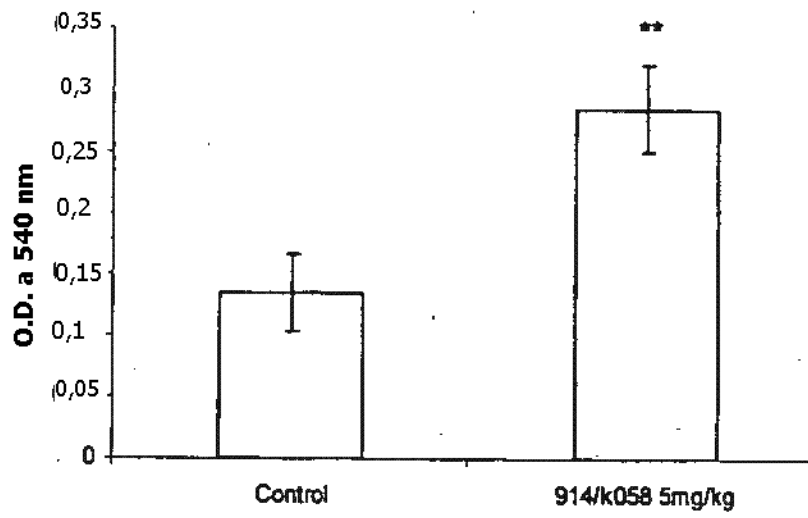


Fig 16 C

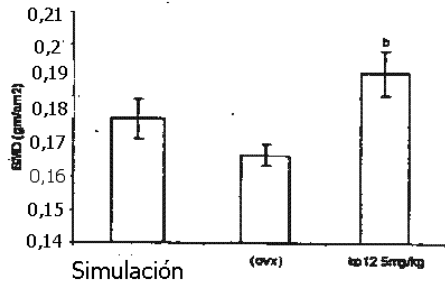


Fig 17 A

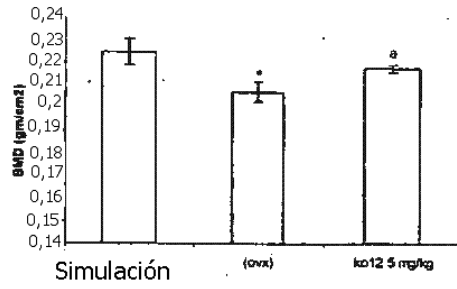


Fig 17 B

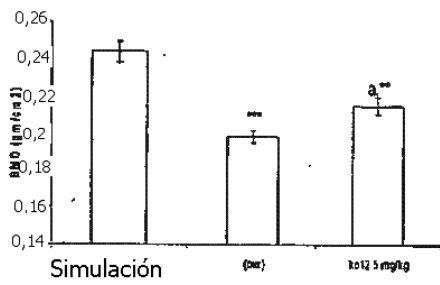


Fig 17 C

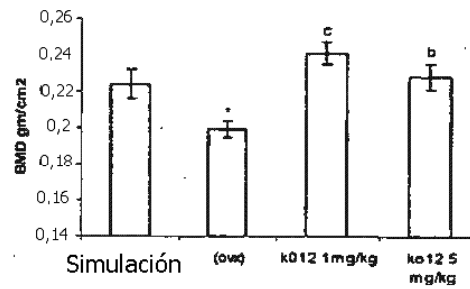


Fig 17 D

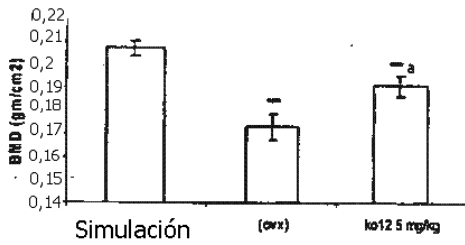


Fig 17 E

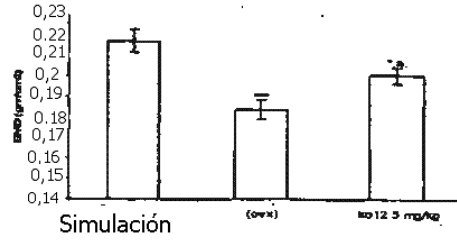


Fig 17 F

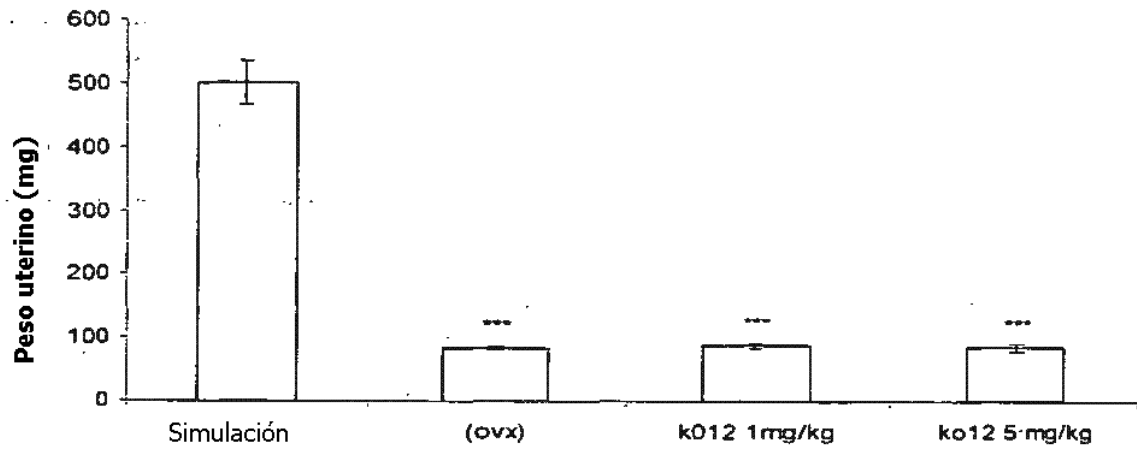


Fig 18