

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 620**

51 Int. Cl.:

A61K 31/352 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2014 PCT/CN2014/088944**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015 WO15058664**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2014 E 14855388 (6)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 3061452**

54 Título: **Icaritina para uso en la prevención o el tratamiento de la hematocitopenia**

30 Prioridad:

21.10.2013 CN 201310493718
04.12.2013 CN 201310646101

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2019

73 Titular/es:

**LUNAN PHARMACEUTICAL GROUP
 CORPORATION (100.0%)
 No. 209 Hongqi Road
 Linyi, Shandong 276006, CN**

72 Inventor/es:

**ZHAO, ZHIQUAN;
 YAO, JINGCHUN;
 LI, XIN;
 GUAN, YONGXIA y
 LI, GUANGYAN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
 Bemerkungen) en el folleto original publicado por
 la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 698 620 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

Icaritina para uso en la prevención o el tratamiento de la hematocitopenia

5 Campo técnico

La presente solicitud se refiere al uso médico de la icaritina, en particular, a su uso para preparar un medicamento para prevenir o tratar la hematocitopenia, tal como se define en las reivindicaciones.

10 Técnica anterior

La sangre normal comprende una gran cantidad de células, entre ellas glóbulos rojos que transportan oxígeno y glóbulos blancos que combaten las infecciones. Los glóbulos blancos incluyen neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los glóbulos blancos son producidos por la hematopoyesis de la médula ósea. La sangre normal también
15 comprende plaquetas. Las plaquetas son fragmentos de células diminutas que inducen la coagulación de la sangre. Las células sanguíneas en el cuerpo humano son producidas por el sistema hematopoyético. El sistema hematopoyético del cuerpo humano está compuesto por una pequeña cantidad de células madre hematopoyéticas de médula ósea y diferentes series de células hematopoyéticas en diferentes etapas de desarrollo, y es muy sensible a los factores peligrosos producidos por diversos procesos físico-químicos y el metabolismo in vivo, como la
20 fatiga corporal, la exposición a la radiación o a ciertos fármacos quimioterapéuticos, etc., que pueden causar enfermedades como la anemia inducida por la hematocitopenia, la supresión de la médula ósea, etc. Además, también existe la hematocitopenia primaria, como la púrpura trombocitopénica primaria, etc.

Los pacientes de cáncer deben recibir tratamientos que incluyen principalmente radioterapia y quimioterapia durante
25 un período relativamente prolongado. La radioterapia y la quimioterapia son terapias en las que la radiación y los agentes citotóxicos se utilizan para tratar el cáncer. Sin embargo, la radioterapia y la mayoría de las quimioterapias no son específicas y son tóxicas para las células normales y de división rápida. La radiación en altas dosis también es tóxica para las células normales y de división rápida. Esto a menudo produce diversos efectos secundarios en
30 pacientes que reciben quimioterapia y radioterapia. Aunque otros tejidos normales también pueden verse afectados negativamente, la médula ósea es particularmente sensible a tratamientos específicos de proliferación como la quimioterapia o la radioterapia. La supresión de la médula ósea, es decir, la reducción de la producción de células sanguíneas en la médula ósea es uno de estos efectos secundarios. Esto se refleja en la reducción de la función de proliferación de la médula ósea, la reducción del recuento de células sanguíneas, la reducción de leucocitos en la sangre periférica, la reducción de neutrófilos y/o la trombocitopenia, o incluso la anemia aplásica, que afecta
35 gravemente la calidad de la supervivencia de los pacientes, o que incluso puede poner en peligro la vida.

Clínicamente, los pacientes que reciben radioterapia o quimioterapia son muy susceptibles a los daños y sufren diferentes grados de supresión de la médula ósea. Esto se refleja en la reducción de la cantidad de leucocitos en la sangre periférica, la reducción de la cantidad de neutrófilos y/o la trombocitopenia. En la sangre periférica del cuerpo
40 humano, los neutrófilos representan alrededor del 50-70 % de la cantidad total de glóbulos blancos, y el aumento y la disminución de los mismos afectan directamente al cambio en el número total de glóbulos blancos. Es decir, los glóbulos blancos aumentan con el aumento de los neutrófilos; y la cantidad total de glóbulos blancos se reduce con la reducción de los neutrófilos. La correlación entre los dos números también se manifiesta en la coherencia de sus significancias, es decir, la significancia del aumento y la disminución de los neutrófilos es sustancialmente la misma
45 que la del aumento y la disminución de la cantidad total de glóbulos blancos. Los pacientes en estado de supresión de la médula ósea son susceptibles a las infecciones. Las deficiencias en los neutrófilos y las plaquetas son las principales razones de la morbilidad y la mortalidad después del tratamiento del cáncer y producen un alto costo en el tratamiento del cáncer.

Sin embargo, la radioterapia y la quimioterapia siguen siendo actualmente los medios más utilizados en el
50 tratamiento de los tumores. Las complicaciones como la supresión hematopoyética de la médula ósea y otras similares inducidas por la radioterapia y la quimioterapia se han convertido en factores importantes que afectan la calidad de supervivencia de los pacientes. Algunos fármacos químicos que tienen una eficacia explícita para ayudar al tratamiento del tumor causarían muchos efectos adversos después de su uso por sí mismos, lo que aumentaría el
55 dolor de los pacientes. Muchos médicos están procurando buscar fármacos que sean eficaces y que presenten menos efectos secundarios para combatir los daños causados por la radioterapia y la quimioterapia.

En el tratamiento clínico actual de la supresión de la médula ósea, se suelen administrar diversos factores de crecimiento para aumentar la proliferación de células hematopoyéticas. Los factores de crecimiento hematopoyético
60 recombinados con genes comercializados en los últimos años, como leucomax (rhGM-GSF), filgrastim (rhG-CSF) y

otros similares, son significativos cuando se utilizan para aumentar los glóbulos blancos. Sin embargo, son costosos y no son asequibles para la mayoría de los pacientes. Además, rhGM-GSF y rhG-CSF no se pueden usar simultáneamente con quimioterapia, ni se pueden usar profilácticamente, y sólo se pueden administrar cuando se presenta leucocitopenia; de lo contrario, se generarían efectos secundarios tóxicos. Además, las terapias génicas que utilizan factores de crecimiento hematopoyético, como IL-6, IL-3, etc., aún se encuentran en fase de pruebas en animales. Por otro lado, el trasplante autólogo de médula ósea a menudo se utiliza en combinación con quimioterapia de alta dosis y es difícil de aplicar repetidamente. Por lo tanto, encontrar un método seguro, eficaz y económico para prevenir y tratar la hematocitopenia, en particular la que resulta de los efectos secundarios de la quimioterapia y la radioterapia, y aumentar la cantidad de glóbulos blancos después de la quimioterapia y la radioterapia, sería muy importante para mejorar la eficacia de la quimioterapia y la radioterapia de los tumores, ya que prolongaría el tiempo de supervivencia y mejoraría la calidad de supervivencia de los pacientes oncológicos.

La trombocitopenia es una enfermedad en la que la reducción de las plaquetas en la sangre periférica provoca hemorragias de la mucosa cutánea y de los órganos internos, lo que se manifiesta principalmente por petequias y equimosis cutáneas espontáneas, hemorragias de la mucosa, epistaxis y hemorragia de las encías, aparición de ampollas de color púrpura en la mucosa bucal y en la lengua, etc. Es una enfermedad clínicamente común caracterizada por trastornos de coagulación y hemorragia o hemorragia más grave y potencialmente mortal, y representa aproximadamente el 30 % de las enfermedades hemorrágicas clínicas.

Las causas de la trombocitopenia se pueden dividir en: (1) Reducción de la producción o ineficiencia y muerte de las plaquetas: incluidas las heredadas y las adquiridas. La reducción adquirida en la producción de plaquetas se debe a determinados factores, como fármacos, tumores malignos, infecciones, radiaciones ionizantes, etc., que dañan las células madre hematopoyéticas o interfieren con su proliferación en la médula ósea. Puede afectar diversos sistemas celulares hematopoyéticos, y se acompaña comúnmente con diferentes grados de anemia, leucopenia y reducción significativa de los megacariocitos de la médula ósea. (2) Destrucción excesiva de plaquetas: incluidas las congénitas y las adquiridas. La destrucción excesiva de plaquetas adquirida incluye la inmunitaria y la no inmunitaria. La destrucción excesiva de plaquetas inmunitaria común incluye la púrpura trombocitopénica idiopática y la trombocitopenia inducida por fármacos. La destrucción excesiva de plaquetas no inmunitaria incluye infecciones, coagulación intravascular diseminada, púrpura trombocitopénica trombótica, etc. (3) Retención excesiva de plaquetas en el bazo: el ejemplo más común es la hiperfunción del bazo.

La nosogénesis de la trombocitopenia incluye lo siguiente: 1) Factores inmunitarios: que incluyen clínicamente la trombocitopenia inducida por enfermedades inmunitarias como enfermedad hepática grave, lupus eritematoso, púrpura trombocitopénica idiopática, etc., en donde los anticuerpos dañan las plaquetas; 2) Factores infecciosos: los factores comunes que causan la trombocitopenia y las infecciones bacterianas y virales pueden dañar directamente las células hematopoyéticas y reducir el crecimiento de las plaquetas. La fase de ataque agudo de la anemia aplásica, la leucemia aguda o similares, suele ir acompañada de infección grave y tendencia al sangrado, como petequias o eritema en la piel, o sangrado nasal de causa desconocida, etc.; 3) Factores relacionados con los fármacos: determinados fármacos pueden provocar la reducción del recuento de plaquetas en la sangre periférica, lo que provoca enfermedades hemorrágicas; y 4) Disfunción plaquetaria: como la trombocitopenia, el síndrome de Bernard-Soulier, etc.

Clínicamente, la trombocitopenia más común incluye la púrpura trombocitopénica inmunitaria (ITP) y la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), donde la ITP es, desde el punto de vista clínico, la causa más común de la trombocitopenia. La ITP se ha considerado durante mucho tiempo como una enfermedad hemorrágica causada por trombocitopenia con causas desconocidas, y por lo tanto se la conoce como púrpura trombocitopénica primaria o idiopática. Posteriormente se descubrió que existen autoanticuerpos en pacientes con ITP, que identifican los autoantígenos plaquetarios. La unión de autoanticuerpos con el antígeno plaquetario acorta la vida de las plaquetas, aumenta el daño y reduce la cantidad de plaquetas, lo que indica que esta enfermedad es una enfermedad hemorrágica asociada con la respuesta inmunitaria.

En la clínica, la púrpura trombocitopénica inmunitaria (ITP) es una enfermedad hemorrágica relativamente común, y puede ocurrir en cualquier etapa de la vida con una tasa de incidencia estimada de ITP en la población de 1/10000. Generalmente es aguda en los niños y crónica en los adultos, y se suele presentar en niños y adultos jóvenes. Las manifestaciones clínicas incluyen petequias de la piel y equimosis, hemorragias en la mucosa de la piel, mientras que los pacientes gravemente enfermos pueden sufrir dolor articular o abdominal, hemafecia, hematemesis, colapso o similares. En casos más graves, se puede convertir en nefritis púrpura. La púrpura trombocitopénica primaria es un síndrome inmunitario y una enfermedad hemorrágica común, caracterizada por la presencia de anticuerpos antiplaquetarios en la circulación sanguínea, que destruyen las plaquetas en exceso y provocan la púrpura, así como por la presencia de megacariocitos normales o aumentados en la médula ósea e inmadurez.

Hasta la fecha, la primera opción para el tratamiento de la púrpura trombocitopénica por la medicina occidental es la hormona de la corteza suprarrenal. Si bien la hormona puede aumentar las plaquetas, una vez que la hormona se administra a una dosis reducida o se interrumpe, las plaquetas volverían a reducirse. El uso frecuente de la hormona provocaría efectos secundarios significativos en el cuerpo humano y provocaría enfermedades como la obesidad central, la hipertensión y la diabetes durante el tratamiento. Otros tratamientos, como la infusión de plaquetas, la resección del bazo y otros similares, tienen desventajas como el aumento de las tasas de infección, lo que provoca úlcera péptica activa, hemorragia, reducción de la función inmunológica, hiperglucosemia o similares, empeoramiento de los síntomas después de la interrupción del fármaco, y una eficacia no persistente. Cuando se emplean terapias convencionales como inmunosupresores y resección del bazo, la enfermedad no se puede erradicar en muchos pacientes debido al síndrome de abstinencia hormonal como consecuencia de la contraindicación y los efectos secundarios de las hormonas. Además, los inmunosupresores no se pueden utilizar ampliamente debido a los efectos secundarios tóxicos significativos, la recaída después de la interrupción del fármaco y los riesgos de supresión de la médula ósea y los tumores inducidos. En los últimos años, siguen surgiendo nuevas terapias como el impacto de las dosis altas de gammaglobulina y el reemplazo de plasma, pero todavía faltan medidas terapéuticas fundamentales.

Epimedio se refiere a tallos y hojas secos de la planta *Epimedium brevicornum* Maxim., *Epimedium sagittatum* Maxim., *Epimedium pubescens* Maxim. o *Epimedium koreanum* Nakai, de la familia Berberidaceae y se utiliza principalmente en la clínica para el tratamiento de la insuficiencia del yang de los riñones, la impotencia y la micción frecuente, la esterilidad; la artralgia debida a la humedad del viento, el entumecimiento y el espasmo de las extremidades, la flacidez de los tendones y los huesos, la dificultad en la marcha, la insuficiencia del yang de los riñones, la disnea con tos y la falta de aliento. La icariina puede aumentar el flujo sanguíneo cardio-cerebrovascular, promover la función hematopoyética, la función inmunológica y el metabolismo óseo, y tener eficacias tales como tonificar el riñón para fortalecer el yang, antienvjecimiento, antitumorales, etc. La icaritina (IT) es un componente monomérico del poli-hidroxi flavonoide en la planta, epimedio, en el género *Epimedium* de la familia Berberidaceae. Estudios farmacológicos han demostrado que IT tiene un efecto anti-osteoporosis más fuerte que otros compuestos glicósidos flavonoides en el epimedio, y tiene el efecto de promover la actividad de los osteoblastos e inhibir la actividad de los osteoclastos.

En los últimos años, la icariina y la icaritina, como componentes activos importantes del epimedio, han despertado el interés de los médicos de forma creciente. Por ejemplo, la solicitud de patente china CN101637467A describe el uso de la icaritina para preparar un medicamento para el tratamiento de la osteoporosis. La patente estadounidense n.º 6399579 describe el uso de la icaritina en el tratamiento de la disfunción sexual. En "30 Cases of Combined Treatment of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine of Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura" (publicado en "Jilin Journal of Traditional Chinese Medicine", 2010, edición n.º 7), Ningxia Qiang logró efectos terapéuticos relativamente buenos en el tratamiento de la púrpura trombocitopénica idiopática crónica al tomar la medicina china tradicional para vigorizar el bazo y tonificar el riñón (Ginseng, Radix Astragali, Chinese Angelica, Fructus Corni, Epimedium, Fructus Psoraleae, etc.) en base al tratamiento de la medicina occidental. Sin embargo, el medicamento contiene diversos ingredientes activos y tiene un mecanismo de acción complejo. Por lo tanto, es necesario realizar más estudios sobre el mecanismo y su eficacia. En "Studies on Effect of Icarin in Synergistically Inducing IL-2, 3 and 6" (publicado en "Chinese Journal of Immunology", 1996, edición n.º 1), Yong Zhao, etc. evaluaron el efecto de la icariina para inducir sinérgicamente IL-2, IL-3 e IL-6, respectivamente, mediante el uso del método de cepa celular dependiente y los resultados mostraron que la icariina, con PHA, puede inducir sinérgicamente la célula mononuclear de la amígdala para producir IL-2, 3 y 6 de forma dependiente de la dosis, lo que sugiere que la icariina es un modificador de la respuesta biológica efectiva.

CN-A-1460482 describe la icaritina para uso en el tratamiento de enfermedades del sistema hematopoyético, tales como anemia aplásica o reducción de las plaquetas. Zhao y col. describen en Chin. J. Cell. Mol. Immunol., 26(10), 2010 que la icariina (ICA) mejora la población de glóbulos blancos (WBC), glóbulos rojos (RBC) y plaquetas en ratones tratados anteriormente con el agente quimioterapéutico ciclofosfamida. Ge Linfu y col. describe en China J. Cancer Prev. Treat., 10(7), 2003 que la administración de icariina (ICA) después de la irradiación aumenta el recuento de glóbulos blancos en la sangre periférica, y que ICA puede promover la función hematopoyética en la médula ósea y el bazo. Hasta la fecha, no se ha informado en la bibliografía que la icaritina prevenga o trate la hematocitopenia como se define en las reivindicaciones, especialmente la trombocitopenia inmunitaria o la supresión de la médula ósea inducida por radiación o por químicos.

Resumen de la invención

Un objetivo de la presente solicitud es proporcionar un medicamento para prevenir y/o tratar la hematocitopenia tal como se define en las reivindicaciones, especialmente la trombocitopenia inmunitaria, o un medicamento para prevenir y/o tratar la supresión de la médula ósea inducida por radiación o por químicos. Los inventores actuales llevan mucho tiempo estudiando las actividades farmacológicas de la icaritina, y recientemente descubrieron inesperadamente en otra investigación que la icaritina muestra actividades inesperadas en el alivio de la hematocitopenia, así como en el tratamiento de la trombocitopenia.

La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier objeto que no esté comprendido en el alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente a título informativo. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

En un primer aspecto, la presente solicitud se refiere al uso de la icaritina en la preparación de un medicamento para prevenir o tratar la hematocitopenia, en el que los hematocitos o los glóbulos rojos incluyen los glóbulos blancos, los glóbulos rojos, los neutrófilos o las plaquetas, y la hematocitopenia se manifiesta principalmente por la reducción de los glóbulos blancos o de las plaquetas en la sangre periférica. La hematocitopenia incluye la supresión de la médula ósea inducida por radiación o por químicos, o mielodisplasia primaria.

En algunas realizaciones específicas, la presente solicitud proporciona el uso de la icaritina para prevenir o tratar la supresión de la médula ósea inducida por radiación o por químicos. El químico puede ser un agente quimioterapéutico que puede inducir la supresión de la médula ósea, en particular un fármaco quimioterapéutico que se puede utilizar para tratar los cánceres. Preferentemente, el fármaco quimioterapéutico utilizado para tratar el cáncer es Docetaxel, Tegafur (S-1), o una combinación de estos. En el ejemplo 22 de la presente solicitud, que comprende un experimento que muestra el efecto de la icaritina sobre la supresión de la médula ósea inducida por quimioterapia en ratones con tumores, se ha demostrado que la combinación de un fármaco antitumoral (p. ej., Docetaxel o Tegafur) con icaritina produce un aumento muy significativo de la cantidad total de glóbulos blancos, la cantidad de plaquetas y la cantidad de neutrófilos en los ratones con tumores en comparación con el grupo al que se le administró el fármaco antitumoral solo, mientras que el peso corporal, la ingesta de alimentos y la situación vital de los animales en los grupos a los que se les administra la combinación no mostró una diferencia significativa en comparación con el grupo de control en blanco. En otras palabras, la icaritina en combinación puede no solo aumentar significativamente las células sanguíneas en los ratones con tumores, sino también tener efectos secundarios tóxicos muy bajos. En el ejemplo 23 de la presente solicitud, que comprende un experimento que muestra el efecto de la icaritina sobre la cantidad de células sanguíneas en los ratones que reciben radiación ^{60}Co , se ha demostrado que la combinación de icaritina con radiación ^{60}Co puede aumentar de forma efectiva las cantidades de glóbulos blancos y plaquetas en los ratones, y su efecto de aumentar las células sanguíneas es significativamente superior al del grupo que recibió extracto de epimedio. Los ejemplos anteriores han demostrado que la icaritina tiene efectos inesperados de aliviar la supresión de la médula ósea inducida por la radioterapia o los químicos.

Además, en el ejemplo 24 de la presente solicitud, que comprende un experimento que muestra el efecto de la icaritina sobre los glóbulos blancos y las plaquetas en los ratones NOD/Ltj en el ejemplo 24 de la presente solicitud, se ha demostrado que los grupos de icaritina de dosis altas y dosis bajas muestran un aumento significativo de las cantidades de glóbulos blancos y plaquetas en ratones NOD/Ltj y sus efectos de aumento son significativamente superiores a los de la interleucina, un fármaco terapéutico comúnmente utilizado. Esto sugiere que la icaritina también presenta un efecto terapéutico bueno sobre la mielodisplasia primaria ya que los ratones NOD/Ltj son aquellos con un sistema inmunitario anormal en donde las cantidades de plaquetas y glóbulos blancos evidentemente son inferiores a las cantidades en los ratones normales.

En algunas realizaciones de la presente solicitud, la presente solicitud proporciona el uso de la icaritina en la preparación de un medicamento para prevenir o tratar la trombocitopenia. La trombocitopenia puede ser trombocitopenia inmunitaria, en particular púrpura trombocitopénica idiopática crónica. La trombocitopenia también puede ser trombocitopenia secundaria inducida por la supresión de la médula ósea. En el ejemplo 26 de la presente solicitud, se ha demostrado que la icaritina presenta un efecto terapéutico positivo en las ratas de modelo de ITP crónico, en donde el grupo de dosis alta y el grupo de dosis media muestran un efecto muy significativo del aumento de plaquetas en las ratas ($P < 0.01$) y su efecto de aumento de plaquetas es superior al del control positivo, icaritina. En consecuencia, la composición farmacéutica de la presente solicitud se puede utilizar en la preparación de una formulación farmacéutica para tratar la trombocitopenia, especialmente para tratar la trombocitopenia inmunitaria.

En los usos médicos anteriores de la presente solicitud, la trombocitopenia es preferentemente trombocitopenia secundaria inducida por la supresión de la médula ósea, en donde la supresión de la médula ósea es inducida por

- fármacos químicos. En el ejemplo 28 de la presente solicitud, se ha demostrado que los grupos de icaritina y el grupo de icariina mostraron un efecto terapéutico positivo sobre la trombocitopenia inducida por ciclofosfamida en ratones, y puede aumentar la cantidad de plaquetas en el modelo de trombocitopenia inducida por ciclofosfamida en ratones, donde cada uno de los grupos de icaritina es superior al grupo de icariina en el aumento de la cantidad de plaquetas en el modelo de trombocitopenia inducida por ciclofosfamida en ratones, la icaritina muestra dependencia de la dosis en el aumento de la cantidad de plaquetas en el modelo de trombocitopenia inducida por ciclofosfamida en ratones, y el grupo de icaritina de dosis alta y el grupo de icaritina de dosis media muestran una diferencia significativa en comparación con el grupo de icariina.
- 5
- 10 En otro aspecto, la presente solicitud describe un método para prevenir o tratar la hematocitopenia o la trombocitopenia utilizando icaritina. El método comprende administrar una cantidad efectiva de icaritina a un individuo que lo necesite. El individuo es preferentemente un ser humano.

En el uso de icaritina en la preparación de un medicamento para tratar la hematocitopenia o la trombocitopenia tal como se describe en la presente solicitud, la icaritina se administra típicamente en forma de una composición farmacéutica, y se puede administrar por vía oral o no oral, o se puede administrar por vía oral o no oral de forma segura como una composición formada con vehículos, excipientes y otros aditivos farmacéuticamente aceptables (tales como comprimidos, formulaciones de liberación sostenida, cápsulas, inyecciones y soluciones). La dosificación para administración oral a seres humanos puede ser entre 0,1 mg/kg/d y 100 mg/kg/d. La administración no oral incluye la administración subcutánea, intradérmica, intraarterial, intravenosa, intramuscular, artrósica, intratecal, intracraneal, intratorácica, inyección o infusión intraperitoneal y la administración tópica transnasal, bucal, sublingual, traqueal, uretral, rectal o focal. Se prefiere la administración mediante inyección, donde la dosificación de icaritina administrada a los seres humanos es preferentemente de entre 0,01 mg/kg y 10 mg/kg.

15

20

Además, de acuerdo con la presente solicitud, la icaritina se puede utilizar como el ingrediente activo único para prevenir y/o tratar las enfermedades asociadas con la hematocitopenia o la trombocitopenia, preferentemente para prevenir y/o tratar la supresión de la médula ósea inducida por radiación o por químicos, o la trombocitopenia inmunitaria; o se puede utilizar en combinación con otros fármacos para dicha prevención y/o tratamiento. Dichos otros fármacos que se pueden administrar junto con o prepararse en una composición farmacéutica con icaritina pueden ser otro u otros fármacos para tratar la leucocitopenia (por ejemplo, vitamina B4, leucógeno, alcohol batílico, coenzima A) o uno o más fármacos diferentes que pueden aumentar la cantidad de plaquetas (por ejemplo, interleucina-II, glucocorticoides de dosis baja como prednisona, etc.) para prevenir o tratar la hematocitopenia, en particular para prevenir o tratar la supresión de la médula ósea. Cuando estos fármacos se administran combinados o se preparan en una composición farmacéutica con icaritina para tratar la supresión de la médula ósea, el efecto de la icaritina para aumentar la cantidad de plaquetas o glóbulos blancos se puede mejorar adicionalmente.

25

30

35

De acuerdo con algunas realizaciones, cuando la icaritina de la presente solicitud se utiliza junto con otro fármaco, la relación en peso de los dos fármacos se puede ajustar adecuadamente de acuerdo con la afección y los síntomas del paciente, y la relación en peso del otro fármaco a la icaritina se encuentra preferentemente en el intervalo de (0,005-100):1, más preferentemente (0,005-50):1, incluso más preferentemente (0,01-100):1, por ejemplo (0,05-25):1.

40

Las vías de administración de la icaritina y, opcionalmente, de otros fármacos incluyen las vías parenterales y las vías no parenterales, donde las vías no parenterales incluyen la administración subcutánea, intradérmica, intraarterial, intravenosa, intramuscular, artrósica, intratecal, intracraneal, intratorácica, e inyección o infusión intraperitoneal y la administración tópica transnasal, bucal, sublingual, traqueal, uretral, rectal o focal. Cuando la icaritina se utiliza para prevenir y/o tratar la supresión de la médula ósea inducida por radiación o por químicos, la icaritina se puede administrar antes, después o durante la radioterapia o la quimioterapia. Cuando la icaritina se administra junto con otro fármaco, la icaritina y el otro fármaco se pueden administrar de forma simultánea o secuencial.

45

50

Otro aspecto de la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica (o formulación) para prevenir o tratar las enfermedades asociadas con la hematocitopenia o la trombocitopenia, que comprende icaritina y excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica se utiliza preferentemente para prevenir o tratar la supresión de la médula ósea inducida por radiación o por químicos.

55

Los expertos en la técnica pueden seleccionar excipientes farmacéuticos adecuados según los requisitos reales, y preparar la formulación de la presente solicitud a través de los métodos conocidos en la técnica. La formulación incluye sólidos, líquidos, aceites, emulsiones, geles, aerosoles, inhalantes, pulverizadores, cápsulas, píldoras, parches y supositorios. Cuando se administra por vía oral, la composición se puede formular en comprimidos,

60

gránulos o cápsulas. Para preparar una composición farmacéutica oral, se puede utilizar lactosa o almidón como vehículo. La gelatina, la carboximetil celulosa sódica, la metilcelulosa, la polivinilpirrolidona, etc. son aglutinantes o agentes granuladores adecuados. Como agente desintegrante se puede seleccionar almidón o celulosa microcristalina. El polvo de talco, la sílice coloidal, el estearato de glicerilo, el estearato de calcio o magnesio y otros productos similares se utilizan a menudo como agentes antiadherentes y lubricantes adecuados. Los comprimidos se pueden preparar, por ejemplo, comprimiendo gránulos húmedos. El ingrediente activo se mezcla con el vehículo y opcionalmente con una porción del agente desintegrante para obtener una mezcla, que se granula en un dispositivo adecuado con una solución acuosa, alcohólica o hidroalcohólica de los aglutinantes. Los gránulos se secan y luego se añaden con el agente desintegrante restante, los lubricantes y los agentes antiadherentes, y la mezcla resultante se comprime. La administración se puede realizar en forma de inyección, pero la dosis puede variar según el sujeto a tratar, la vía de administración, los síntomas y otros factores. La dosis real de la icaritina administrada debe ser determinada por un médico de acuerdo con las condiciones pertinentes, incluyendo el estado del sujeto que se está tratando, la vía de administración seleccionada, la edad, el peso corporal y la respuesta individual del paciente al fármaco, la gravedad de los síntomas del paciente, y otros factores similares. La formulación de la inyección es una de solución inyectable, polvo liofilizado para inyección y formulación de infusión. En la formulación de inyección, el excipiente farmacéutico es uno o más de manitol, glucosa, sorbitol, PEG, etanol y solución salina normal. Se prefiere la formulación de inyección que comprende PEG.

En la formulación farmacéutica que contiene icaritina adecuada para el uso médico anterior, cada unidad de formulación puede contener icaritina en una cantidad de entre 0,1 y 500 mg.

Definición de los términos

Tal como se utiliza en la presente, la "icaritina" se puede obtener por extracción, síntesis biológica o síntesis química, y puede incluir icaritina, una sal farmacéutica aceptable o hidrato de la misma. La icaritina de la presente solicitud contiene icaritina con una pureza (por ejemplo determinada por HPLC) de $\geq 90\%$, $\geq 95\%$ o $\geq 98\%$. Todos los métodos para preparar la icaritina descritos en la técnica anterior antes de la fecha de presentación de la presente solicitud se pueden utilizar como procesos para preparar la icaritina de la presente solicitud.

En la presente solicitud, la expresión "supresión de la médula ósea" se refiere a una afección donde los componentes de las células sanguíneas, incluidos los glóbulos blancos, los glóbulos rojos, los neutrófilos y las plaquetas, se reducen individual o simultáneamente, lo cual se manifiesta por la reducción en la producción de células sanguíneas. La médula ósea sana produce una gran cantidad de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas todos los días. Cuando hay supresión de la médula ósea, estas células producidas por la médula ósea se reducen. Una característica de la supresión de la médula ósea es la reducción de la producción de glóbulos blancos. Esta reducción en la producción de glóbulos blancos puede ser causada por determinado tratamiento, especialmente el tratamiento de cánceres, como la quimioterapia y la radioterapia. Preferentemente, la supresión de la médula ósea de la presente solicitud se manifiesta por la reducción de la cantidad de glóbulos blancos o plaquetas en la sangre periférica, o mielodisplasia. En algunas realizaciones, la reducción de la cantidad de glóbulos blancos en la sangre periférica se refiere a la reducción de la cantidad de neutrófilos en la sangre periférica.

La "radiación" puede ser la que se recibe durante una radioterapia, o la que se recibe debido a otros factores como el trabajo, el entorno, etc. Preferentemente, la radiación en los usos descritos anteriormente es la que se recibe durante una radioterapia, como la radioterapia para el tratamiento de cánceres.

El término "químico" puede referirse a cualquier fármaco o agente químico que pueda causar una reducción en la producción de células sanguíneas. En una realización, el químico en los usos descritos arriba es un agente quimioterapéutico utilizado para tratar cánceres. El agente quimioterapéutico incluye fármacos alquilantes, fármacos antimetabólicos, fármacos antibióticos, fármacos vegetales y fármacos hormonales. Entre ellos, los fármacos alquilantes incluyen mostazas nitrogenadas, ciclofosfamida, tiotepa, lomustina, myleran, dacarbazina y procarbazona; los fármacos antimetabólicos incluyen fluorouracilo (5-FU), ftorafur (FT-207), tegadifur (difuradina FD-1), tegafur-uracilo (UFT), furtulon (5-DFUR), metotrexato (MTX), aminopterina (BaiXueNing), arabinósido de citosina (Ara-c), ciclocitidina, ciclocitidina de cloro, hidroxiurea (HU), dialdehído de inosina, dialdehído de adenosina (adenosinadialde-hgde), guanazol y 6-mercaptopurina (6-MP); los fármacos antibióticos incluyen antibióticos de penicilina, antibióticos de cefalosporina, antibióticos de aminoglicósido, antibióticos de macrólidos, antibióticos de sulfonamida, antibióticos de quinolona y antibióticos de furano; los fármacos vegetales son fármacos derivados de plantas, incluidas las medicinas chinas tradicionales y las fracciones activas o los ingredientes individuales obtenidos de una planta a través de los medios modernos de extracción y separación; los fármacos de hormonas incluyen corticosteroides, hormonas de la corteza suprarrenal, noradrenalinas, progestógenos, estrógenos y andrógenos.

En la presente solicitud, la expresión "excipientes farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualquier sustancia que no interfiera con los efectos fisiológicos de la icaritina y no sea tóxica para ningún sujeto, incluidos los seres humanos. Se han descrito excipientes farmacéuticamente aceptables detalladamente en la Encyclopedia of Pharmaceutical Excipients (página 123, Sichuan Publishing House of Science and Technology, publicado en 1993, LUO Mingsheng and GAO Tianhui, Eds.). Por ejemplo, los excipientes farmacéuticos utilizados comúnmente para preparar formulaciones de microemulsión incluyen aceite de soja, polioxietilén-23-lauril éter, 1,2-propanodiol, cocoglicérido hidrogenado, lauroil polietilenglicol-32-glicérido, polietilenglicol 3350, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón y monoestearato de decaglicerol; los excipientes farmacéuticos que se utilizan comúnmente para preparar formulaciones de píldoras de goteo incluyen polietilenglicol 6000 y polietilenglicol 1000; los excipientes farmacéuticos que se utilizan comúnmente para preparar formulaciones de cápsulas incluyen lactosa y almidón de maíz. Los vehículos farmacéuticos que se utilizan comúnmente para preparar formulaciones de cápsula blanda incluyen glicéridos de ácidos grasos de cadena media, aceite de ricino polioxietileno, 1,2-propanodiol, etc.

En la presente solicitud, el término "trombocitopenia" se refiere a una enfermedad en la que la reducción de las plaquetas en la sangre periférica provoca hemorragias de la mucosa cutánea y de los órganos internos, lo que se manifiesta principalmente por petequias y equimosis cutáneas espontáneas, hemorragias de la mucosa, epistaxis y hemorragia de las encías, aparición de ampollas de color púrpura en la mucosa bucal y en la lengua, etc. Es una enfermedad clínicamente común caracterizada por trastornos de coagulación y hemorragia o hemorragia más grave y potencialmente mortal, y representa aproximadamente el 30 % de las enfermedades hemorrágicas clínicas. Puede ser trombocitopenia inmunitaria o trombocitopenia secundaria.

La "trombocitopenia inmunitaria" es una enfermedad hemorrágica provocada por trastornos del sistema inmunitario y se refiere principalmente a la púrpura trombocitopénica inmunitaria (ITP). La ITP es una enfermedad hemorrágica relativamente común, y puede ocurrir en cualquier etapa de la vida con una tasa de incidencia estimada de ITP en la población de 1/10000. Las manifestaciones clínicas incluyen petequias de la piel y equimosis, hemorragias en la mucosa de la piel, mientras que los pacientes gravemente enfermos pueden sufrir dolor articular o abdominal, hemafecia, hematemesis, colapso o similares. En casos más graves, se puede convertir en nefritis púrpura.

La "púrpura trombocitopénica primaria" o "púrpura trombocitopénica idiopática" es una trombocitopenia inmunitaria. Es una enfermedad hemorrágica adquirida de causa desconocida, y se caracteriza principalmente por la reducción de las plaquetas, la presencia de megacariocitos normales o aumentados en la médula ósea normal, y la falta de cualquier causa. Esta enfermedad generalmente se presenta en niños y adultos jóvenes. Generalmente es aguda en los niños y crónica en los adultos. Se caracteriza por la presencia de anticuerpos antiplaquetarios en la circulación sanguínea, que destruyen las plaquetas en exceso y provocan la púrpura, así como por la presencia de megacariocitos normales o aumentados en la médula ósea normal e inmadurez.

La "trombocitopenia secundaria", también denominada trombocitopenia adquirida, es la trombocitopenia secundaria a otras enfermedades o inducida por el tratamiento con fármacos de enfermedades, que comprende una gran cantidad de enfermedades y fármacos. Incluye la trombocitopenia inmunitaria relacionada con fármacos, otra trombocitopenia inmunitaria como el síndrome de Evans, la leucemia linfocítica crónica, diversas leucemias agudas, el linfoma, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la hipertireosis, etc. La trombocitopenia secundaria de acuerdo con la invención es inducida por la supresión de la médula ósea debido a la radiación o los fármacos químicos.

La icaritina de la presente solicitud, para prevenir o tratar enfermedades asociadas con la hematocitopenia, especialmente para prevenir o tratar la supresión de la médula ósea inducida por radiación o químicos, muestra al menos las siguientes ventajas:

1) Previene la reducción de los glóbulos blancos mientras se trata el cáncer, e incluso aumenta la cantidad de neutrófilos, lo que mejora la eficacia de la quimioterapia en los tumores y esto prolonga el tiempo de supervivencia y mejora la calidad de supervivencia de los pacientes con cáncer. A través de un experimento que muestra el efecto de la icaritina sobre la supresión de la médula ósea inducida por la quimioterapia en los ratones con tumores, se ha descubierto que la icaritina presenta un efecto inesperado de aliviar la supresión de la médula ósea. Específicamente, en comparación con el grupo modelo, tanto la cantidad total de glóbulos blancos como la cantidad de neutrófilos en los grupos de icaritina aumenta con una diferencia muy significativa ($P < 0,01$) o con una diferencia significativa ($P < 0,05$). Mientras tanto, en comparación con el grupo de docetaxel y el grupo de tegafur, tanto la cantidad total de glóbulos blancos como la cantidad de neutrófilos en los grupos de icaritina aumenta drásticamente con una diferencia muy significativa ($P < 0,01$).

2) Se puede administrar al mismo tiempo que la quimioterapia con otros fármacos, y también se puede administrar profilácticamente, no se administra solo cuando se produce leucocitopenia y, por lo tanto, reduce los efectos

secundarios en cierta medida. También se puede observar a partir de los resultados de las pruebas que la icaritina, como agente anticancerígeno, incluso cuando se administra en combinación con docetaxel o tegafur, funciona para inhibir el crecimiento tumoral y, al mismo tiempo, alivia la supresión de la médula ósea inducida por docetaxel o tegafur. En consecuencia, se puede administrar la icaritina al mismo tiempo que la quimioterapia con otros fármacos, y también se puede administrar profilácticamente, y no se administra solo cuando se produce leucocitopenia. Esto promueve la hematopoyesis de la médula ósea y aumenta las cantidades de glóbulos blancos y neutrófilos, al tiempo que garantiza la tasa de inhibición del tumor, y reduce los efectos secundarios en cierta medida. Como se puede observar en los resultados de las pruebas de la tabla 1, en comparación con el grupo modelo, los ratones de los grupos de icaritina sola o en combinación no muestran diferencias significativas en el peso corporal durante la administración, y los animales tampoco muestran diferencias significativas en la ingesta de alimentos y la situación vital. Esto demuestra que la icaritina no tiene efectos secundarios tóxicos significativos como agente antitumoral y fármaco para aliviar la supresión de la médula ósea.

3) También tiene un efecto significativo en la prevención o el tratamiento de la supresión de la médula ósea que se produce durante la radioterapia. Se ha descubierto a través de un experimento que muestra el efecto de la icaritina sobre los glóbulos blancos y las plaquetas en ratones con tumores que reciben 4 Gy de radiación ⁶⁰Co (tabla 3) que la icaritina tiene un efecto inesperado de aliviar la supresión de la médula ósea inducida por la radioterapia. Específicamente, tanto la cantidad total de glóbulos blancos como la cantidad total de plaquetas en el grupo de la icaritina aumentan con una diferencia muy significativa ($P < 0,01$) o con una diferencia significativa ($P < 0,05$) en comparación con el grupo modelo; y con una diferencia significativa ($P < 0,05$) en comparación con el grupo del extracto de epimedio.

La icaritina muestra efectos terapéuticos significativos sobre la trombocitopenia inducida por diversos factores. En el ejemplo 26 de la presente solicitud, se ha demostrado que la icaritina es superior al control positivo, icariina, en el aumento de plaquetas en las ratas del modelo de ITP crónica. El grupo de dosis alta y el grupo de dosis media muestran efectos muy significativos del aumento de plaquetas en las ratas ($P < 0,01$). En el ejemplo 27 de la presente solicitud, se ha demostrado que la icaritina también tiene un efecto terapéutico positivo en el tratamiento de la trombocitopenia inmunitaria activa en los ratones.

La icaritina también muestra un efecto terapéutico positivo sobre la trombocitopenia secundaria inducida por la supresión de la médula ósea, lo que sugiere que se puede administrar en combinación con otros fármacos químicos para reducir el daño que causan los químicos (como los fármacos quimioterapéuticos) en el cuerpo. En el ejemplo 28 de la presente solicitud, se ha demostrado que los grupos de icaritina y el grupo de icariina mostraron un efecto terapéutico positivo sobre la trombocitopenia inducida por ciclofosfamida en ratones, y puede aumentar la cantidad de plaquetas en el modelo de trombocitopenia inducida por ciclofosfamida en ratones, donde cada uno de los grupos de icaritina es superior al grupo de icariina en el aumento de la cantidad de plaquetas en el modelo de trombocitopenia inducida por ciclofosfamida en ratones, y el grupo de icaritina de dosis alta y el grupo de icaritina de dosis media muestran una diferencia significativa en comparación con el grupo de icariina.

La icaritina es un ingrediente efectivo y activo extraído del medicamento tradicional chino, epimedio. Demuestra una eficacia explícita en el tratamiento de la trombocitopenia y es adecuada para la combinación de fármacos. Además, tiene efectos secundarios tóxicos muy bajos, que pueden aumentar enormemente el cumplimiento de los pacientes, lo que asegura los efectos terapéuticos del fármaco. Además, actualmente existen muchos métodos para preparar la icaritina, que son simples y económicos. Por lo tanto, el costo del tratamiento de los pacientes con trombocitopenia se puede reducir en gran medida.

Realizaciones específicas

La presente solicitud se describirá más detalladamente con los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: formulación de microemulsión de icaritina

Icaritina	10 g
Aceite de soja	35 g
Polioxietilen-23-lauril éter	60 g
1,2-propanodiol	30 g

Proceso de preparación: se pesaron las cantidades indicadas de aceite de soja, polioxietilen-23-lauril éter y 1,2-propanodiol, se mezclaron y se agitaron bien, luego se agregó y se disolvió la icaritina, en ese momento se puede utilizar sonicación para acelerar la disolución, con el fin de dar una solución clara, que fue la formulación de

microemulsión de icaritina. Se determinó el tamaño de partícula mediante un analizador de tamaño de partículas láser y el tamaño de partícula promedio fue de 15 nm.

Ejemplo 2: formulación de microemulsión de icaritina

5

Icaritina	0,1 g
Coco-glicérido hidrogenado	5 g
Lauroil polietilenglicol-32-glicérido	20 g
1,2-propanodiol	5 g
Polietilenglicol 3350	20 g

Proceso de preparación: se pesaron las cantidades indicadas de coco-glicéridos hidrogenados, lauroil polietilenglicol-32-glicérido, 1,2-propanodiol y polietilenglicol 3350, se mezclaron y se agitaron bien, luego se agregó y se disolvió la icaritina, en ese momento se puede utilizar sonicación para acelerar la disolución, con el fin de dar una solución clara, que fue la formulación de microemulsión de icaritina. Se determinó el tamaño de partícula mediante un analizador de tamaño de partículas láser y el tamaño de partícula promedio fue de 40 nm.

Ejemplo 3: inyección de icaritina

Icaritina	500 g
PEG-400	2 L
Etanol	0,5 L
Solución de NaCl al 0,9 %	Se agregó hasta 10 L

15

Proceso de preparación: se agregó icaritina a la cantidad indicada de PEG-400 y se agitó para disolver, seguido del agregado de solución de NaCl al 0,9 % hasta 10 L. Se agitó bien la mezcla y luego se le agregó carbón activado al 0,5 % para inyección, se agitó y se eliminó el carbón para dar la inyección de icaritina.

Ejemplo 4: inyección de icaritina

Icaritina	10 g
Etanol	2 L
Tween-80	1500 g
Agua para inyectables	Se agregó hasta 10 L

25

Proceso de preparación: se mezclaron bien las cantidades indicadas de etanol y tween-80, seguidas del agregado, agitación y disolución de icaritina, y el agregado de agua para inyección hasta 10 L. Se agitó bien la mezcla y luego se le agregó carbón activado al 0,5 % para inyección, se agitó y se eliminó el carbón para dar la inyección de icaritina.

Ejemplo 5: inyección de icaritina

Icaritina	1 g
Etanol	3,3 L
Agua para inyectables	Se agregó hasta 10 L

30

Proceso de preparación: se agregó icaritina a la cantidad indicada de etanol, se agitó para disolver, seguido del agregado de agua para inyección hasta 10 L. Se agitó bien la mezcla y luego se le agregó carbón activado al 0,5 % para inyección, se agitó y se eliminó el carbón para dar la inyección de icaritina.

Ejemplo 6: formulación de píldora de goteo de icaritina

Icaritina	5,0 g
Polietilenglicol-6000	14,5 g
Polietilenglicol-1000	5,0 g
	Se elaboraron 1000 píldoras

Proceso de preparación: se pesó la cantidad indicada de icaritina que había pasado a través de un tamiz de 100 mesh y se agregó a un líquido mezclado de las cantidades indicadas de polietilenglicol 6000 y polietilenglicol 1000,

que se habían calentado y derretido en un baño de agua. La mezcla se agitó bien, se introdujo en un frasco colector, se escurrió a 95 ± 2 °C en una columna de condensación de vidrio que contenía 4-6 mL de aceite de silicona de metilo y se retiró después de la formación. Se obtuvo la formulación de la píldora de goteo de icaritina después de que el aceite de silicona de metilo fue absorbido con papel absorbente.

5

Ejemplo 7: formulación de cápsulas blandas entéricas de icaritina

Fórmula del contenido:

Icaritina	10 g
Etanol absoluto	10 g
1,2-propanodiol	10 g
Aceite de ricino polioxietileno	50 g
Glicérido de ácido graso de cadena media	20 g

10 Fórmula de la cubierta de la cápsula:

Gelatina	10 g
Glicerol	5 g

Fórmula de la solución de recubrimiento entérico:

Eudragit L30D-55	100 g
Citrato de trietilo	3 g
Polvo de talco	7,5 g
Agua purificada	200 g

Proceso de preparación: se pesaron las cantidades indicadas de glicérido de ácido graso de cadena media, aceite de ricino polioxietileno, 1,2-propanodiol y etanol absoluto, se mezclaron y se agitaron bien, luego se agregó y se disolvió la icaritina, en ese momento se puede utilizar sonicación para acelerar la disolución, con el fin de dar un concentrado claro, que fue el concentrado de microemulsión de icaritina. Se diluyó el concentrado de microemulsión obtenido como se indicó arriba con agua en una proporción en peso de 1:10-20 para dar una solución clara, que fue el contenido de microemulsión para la cápsula blanda. Las cantidades indicadas de gelatina, glicerol y agua purificada se mezclaron bien y se comprimieron en la cubierta de la cápsula. Además, se mezclaron bien las cantidades indicadas de Eudragit L30D-55, citrato de trietilo, polvo de talco y agua purificada para dar la solución de recubrimiento entérico. El contenido de la microemulsión para la cápsula blanda que contenía icaritina se envolvió con la cubierta de la cápsula para dar la cápsula blanda, que después se recubrió con el recubrimiento entérico para dar la cápsula blanda entérica.

25

Ejemplo 8: formulación de la cápsula de icaritina

Icaritina	100 g
Fécula de maíz	130 g
Estearato de magnesio	5 g

Proceso de preparación: se mezclaron 100 g de icaritina, 120 g de lactosa y 130 g de almidón de maíz en un mezclador durante 10-15 minutos, seguido del agregado de 5 g de estearato de magnesio y se mezcló durante 1-3 minutos, y después se introdujo en 1000 cubiertas de cápsulas, para dar la formulación de la cápsula de icaritina.

Ejemplo 9: comprimidos de icaritina

Icaritina	5000 g
Celulosa microcristalina	200 g
Carboximetil almidón sódico	8 g
Estearato de magnesio	1,5 g
Suspensión de almidón al 8 %	Cantidad adecuada

35

Proceso de preparación: Se mezclaron bien icaritina y los excipientes celulosa microcristalina y carboximetil almidón sódico, seguidos de la adición de una cantidad adecuada de suspensión de almidón para producir un material blando, que se pasó a través de un tamiz de 16 mesh y se granuló. El granulado húmedo se secó a 60 °C y el granulado seco se pasó por un tamiz de 20 mesh y se granuló. Los polvos finos en el granulado seco se tamizaron y

se mezclaron bien con estearato de magnesio, luego se mezclaron bien con el granulado seco y se comprimieron en comprimidos con aproximadamente 200 mg por comprimido.

Ejemplo 10: Icaritina en polvo para inyección

5

Icaritina	100 g
Glucosa	20 g
Agua para inyectables	Se agregó hasta 1000 ml
Se liofilizó	En total 6000 viales

Proceso de preparación: Se pesó la cantidad indicada de materia prima de icaritina para la inyección y se agregó a una cantidad adecuada de agua para inyección para su disolución. Después, se agregó y se mezcló bien una cantidad específica que había sido sometida previamente a tratamientos de esterilización y despirogenación, seguida del agregado de agua para inyección hasta alcanzar el volumen indicado, es decir, 1000 ml. A la solución anterior se le agregaron 5 g de carbón activo para inyección, se calentó a 60-80 °C durante 30 minutos, se filtró con una membrana filtrante y se recogió el filtrado. Se sometió el filtrado anterior a filtración aséptica a presión positiva con un filtro esterilizante de acuerdo con la manipulación aséptica, y después se filtró con una membrana filtrante microporosa de 0,22 µm. El filtrado se sometió a una prueba con pirógenos y a una prueba del contenido del producto semiacabado antes de ser subenvasado en viales de penicilina. El material se precongelo a -40 °C en una caja especial de liofilización durante 1,5-3,5 horas, se sublimó al vacío y se calentó y se secó después de que se eliminara el 90 % del agua libre (la temperatura máxima no superó los 35 °C). Después de la liofilización, se obtuvo el polvo de icaritina para inyección.

20 Ejemplo 11: inyección de icaritina

Icaritina	10 mg
Propanodiol	3 ml
Etanol	0,5 ml
Solución de NaCl al 0,9 %	Se agregó hasta 10 ml

Proceso de preparación: se mezclaron bien las cantidades indicadas de propanodiol y etanol, seguido del agregado de icaritina, y se agitó para disolver. Se agregó la cantidad indicada de solución de NaCl al 0,9 % y se mezcló bien, luego se le agregó carbón activado al 0,5 % para inyección, se agitó y se eliminó el carbón para dar la inyección de icaritina.

Ejemplo 12: inyección de icaritina

Icaritina	10 mg
PEG-400	2 ml
Solución de NaCl al 0,9 %	Se agregó hasta 10 ml

30

Proceso de preparación: se agregó la cantidad indicada de PEG-400 a la icaritina, y se agitó para su disolución, seguido del agregado de solución de NaCl al 0,9 % hasta 10 ml. Se agitó bien la mezcla y luego se le agregó carbón activado al 0,5 % para inyección, se agitó y se eliminó el carbón para dar la inyección de icaritina.

35 Ejemplo 13: inyección de icaritina

Icaritina	50 mg
Etanol	3,5 ml
Tween-80	1,5 g
Agua para inyectables	Se agregó hasta 10 ml

Proceso de preparación: se mezclaron bien las cantidades indicadas de etanol y tween-80. Se agregó icaritina y se agitó para disolver. Se agregó solución de NaCl al 0,9 % hasta 10 ml, se agitó bien y luego se le agregó carbón activado al 0,5 % para inyección, se agitó y se eliminó el carbón para dar la inyección de icaritina.

Ejemplo 14: inyección de icaritina

Icaritina	30 mg
-----------	-------

Etanol	2 ml
Tween-80	1,5 g
Agua para inyectables	Se agregó hasta 10 ml

Proceso de preparación: se mezclaron bien las cantidades indicadas de etanol y tween-80. Se agregó icaritina y se agitó para disolver. Se agregó solución de NaCl al 0,9 % hasta 10 ml, se agitó bien y luego se le agregó carbón activado al 0,5 % para inyección, se agitó y se eliminó el carbón para dar la inyección de icaritina.

5

Ejemplo 15: inyección de icaritina

Icaritina	5 mg
Etanol	2 ml
Tween-80	1,5 g
Agua para inyectables	Se agregó hasta 10 ml

10 Proceso de preparación: se mezclaron bien las cantidades indicadas de etanol y tween-80. Se agregó icaritina y se agitó para disolver. Se agregó solución de NaCl al 0,9 % hasta 10 ml, se agitó bien y luego se le agregó carbón activado al 0,5 % para inyección, se agitó y se eliminó el carbón para dar la inyección de icaritina.

Ejemplo 16: inyección de icaritina

Icaritina	20 mg
Etanol	3,3 ml
Agua para inyectables	Se agregó hasta 10 ml

15

Proceso de preparación: se agregó icaritina a la cantidad indicada de etanol y se agitó para disolver. Se agregó agua para inyección hasta 10 ml y se agitó bien y luego se le agregó carbón activado al 0,5 % para inyección, se agitó y se eliminó el carbón para dar la inyección de icaritina.

20 **Ejemplo 17: inyección de icaritina**

Icaritina	10 mg
Etanol	3,3 ml
Agua para inyectables	Se agregó hasta 10 ml

25 Proceso de preparación: se agregó icaritina a la cantidad indicada de etanol y se agitó para disolver. Se agregó agua para inyección hasta 10 ml y se agitó bien y luego se le agregó carbón activado al 0,5 % para inyección, se agitó y se eliminó el carbón para dar la inyección de icaritina.

Ejemplo 18: comprimidos de icaritina

Icaritina	15 g
Almidón	140 g
Dextrina	120 g
Etanol al 50 %	Cantidad adecuada
Estearato de magnesio	1,0 g

30 Proceso de preparación: se mezclaron bien las cantidades indicadas de icaritina, almidón y dextrina. Después se agregó una cantidad adecuada de etanol al 50 % al polvo mezclado, y se mezcló bien para preparar un material blando, que se pasó a través de un tamiz de nylon de 18 mesh para producir un granulado húmedo. Se secó el granulado húmedo a aproximadamente 60 °C, mientras se controló el contenido de agua en el granulado seco a menos del 1,5 %. Se pasó el granulado seco a través de un tamiz de 20 mesh para granular y después se mezcló
35 con estearato de magnesio y se comprimió en comprimidos.

Ejemplo 19: cápsulas de icaritina

Icaritina	10 g
Celulosa microcristalina	300 g
Gel de sílice micronizado	12 g

Proceso de preparación: se molieron icaritina, celulosa microcristalina y gel de sílice micronizado, se pasaron a 5 través de un tamiz de 100 mesh, se mezclaron bien y se introdujeron directamente en cápsulas.

Ejemplo 20: gránulos de icaritina

Icaritina	45 g
Almidón	200 g
Dextrina	50 g
Sacarosa en polvo	50 g
Etanol al 80%	Cantidad adecuada

10 Proceso de preparación: se pesaron y se mezclaron bien las cantidades indicadas de icaritina, almidón, dextrina y sacarosa en polvo. Después se agregó una cantidad adecuada de etanol al 80% al polvo mezclado, y se mezcló bien para dar un material blando, que se pasó a través de un tamiz de nylon de 18 mesh para producir un granulado húmedo. Se secó el granulado húmedo a aproximadamente 60 °C y después se pasó a través de un tamiz de 20 mesh y se granuló, después se subenvasó para dar los gránulos de icaritina.

15

Ejemplo 21: comprimidos de liberación sostenida de icaritina

Icaritina	10 g
Hidroxipropil metilcelulosa	80 g
Polivinilpirrolidona	100 g
Lactosa	85 g
Gel de sílice micronizado	100 g

20 Proceso de preparación: Las cantidades indicadas de icaritina, lactosa y el agente de liberación sostenida hidroxipropil metilcelulosa se mezclaron bien, seguido del agregado del aglutinante polivinilpirrolidona. Se granuló la mezcla y se secó a 40-80 °C, y se granuló el granulado seco. Se agregó la cantidad indicada del gel de sílice micronizado lubricante al granulado seco y se mezcló bien, y se sometió la mezcla a un prensado perfilado en forma de comprimidos.

25 Ejemplo 22: efecto de la icaritina sobre la supresión de la médula ósea inducida por quimioterapia en ratones con tumores**1. Materiales**

30 1.1 Animales de prueba: ratones Kunming (adquiridos del Instituto Nacional Chino para el Control de Productos Farmacéuticos y Biológicos, Licencia de animal de laboratorio n.º: SCXK II-00-0010), la mitad machos y la otra mitad hembras, de 7 semanas, 18~22 g, temperatura de prueba (20±1) °C, humedad del 40 % ~ 70 %, libre acceso al agua, alimentación normal.

35 1.2 Reactivos de prueba:

reactivos de prueba	Fabricantes o fuentes
Microemulsión de icaritina	Se preparó de acuerdo con el proceso del ejemplo 1, pureza de la icaritina:
Formulación	99,3 %
Docetaxel	Adquirido de Hangzhou Sanofi-Aventis Minsheng Pharmaceuticals Co. Ltd.
Tegafur	Adquirido de Shandong Xinshidai Medicine Industry Co., Ltd.
Células de tumor de ascitis en ratones s180	Adquirido de Shanghai Aiyuan Biological Technology Co. Ltd.
Medio de cultivo 1640	Adquirido de Shanghai Yansheng Biochemical Agents

Co. Ltd.

2. Método:

- se incubaron de forma convencional células de tumor de ascitis en ratones s180 en medio de cultivo 1640, a 37 °C, CO₂ al 5 %, y se pasaron una vez cada dos días en promedio. Se prepararon las células en la fase de crecimiento logarítmico en una suspensión unicelular con una densidad de 3.0×10^7 células/ml con solución salina normal, que se inyectó en las cavidades abdominales de ratones en condiciones estériles. Siete días después de la inoculación, se puede observar una inflamación significativa de las cavidades abdominales de los ratones. En esta ocasión, se ejecutó a los ratones mediante luxación de las vértebras cervicales, se colocaron en un recipiente que contenía etanol al 75 % y se remojaron durante 2~3 minutos. Se colocaron los ratones esterilizados en un banco ultraclean y se expusieron los abdómenes. Se extrajo la ascitis con una jeringa estéril y se colocó en un frasco de reactivo estéril para su uso posterior. La ascitis anterior se contó con azul tripano, se diluyó con solución salina normal para ajustar a $2,0 \times 10^7$ células/ml y se inoculó en la axila derecha de los ratones con 0,2 ml para cada ratón.
- 15 Se dividieron aleatoriamente los ratones inoculados en 6 grupos, con 10 animales en cada grupo y la mitad machos y la mitad hembras.
Grupo 1, el grupo de control modelo: los animales de experimentación se inyectaron intraperitonealmente con solución salina normal al 0,9 % (lo mismo para los experimentos siguientes);
Grupo 2, el grupo de docetaxel: 75 mg/m²/d de docetaxel;
20 Grupo 3, el grupo de tegafur: 222.2 mg/m²/d de tegafur;
Grupo 4, el grupo de icaritina: 10 mg/kg/d de la formulación de microemulsión de icaritina;
Grupo 5, el grupo D + I (grupo de docetaxel + icaritina): 75 mg/m²/d de docetaxel + 10 mg/kg/d de icaritina;
Grupo 6, el grupo T + I (grupo de tegafur + icaritina): 222,2 mg/m²/d de tegafur + 10 mg/kg/d de icaritina.
- 25 Se administraron docetaxel e icaritina mediante inyección intravenosa en la cola con un volumen de administración de 10 ml/kg para cada uno. Se administró intragástricamente tegafur con un volumen de administración de 40 ml/kg. Cada grupo recibió una administración una vez al día durante un total de 10 días. Durante la prueba, se observó a los animales todos los días para controlar su ingesta de alimentos y agua, las condiciones de supervivencia y los comportamientos, y se midieron los pesos corporales todos los días. Después de la prueba, se anestesió y se anatomizó a los ratones. Se recogió sangre de la aorta abdominal para un análisis de sangre de rutina y se determinó la cantidad total de glóbulos blancos, la cantidad total de plaquetas y la cantidad total de neutrófilos.

3. Resultados experimentales:

35 Tabla 1: efecto de la icaritina en los pesos corporales de ratones con tumores

Grupos	Muestra n.	Antes de la administración (g)	Día 5 después de la administración (g)	Día 10 después de la administración (g)
Grupo de control modelo	10	21,2±2,6	30,3±4,1	30,3±4,3
Grupo de Docetaxel	10	21,2±1,8	28,1±2,5	27,2±3,2
Grupo de Tegafur	10	21,3±2,3	29,6±3,2	30,0±3,6
Grupo de icaritina	10	21,1±3,0	27,9±4,2	27,9±3,8
Grupo D + I	10	21,0±2,9	28,4±3,7	27,3±3,5
Grupo T + I	10	21,3±3,5	28,8±3,0	30,1±4,9

- De los resultados de las pruebas de la Tabla 1 se desprende que, en comparación con el grupo modelo, los ratones de los grupos de icaritina sola y en combinación no mostraron diferencias significativas en su peso corporal durante el período de administración. Los animales tampoco mostraron diferencias significativas en la absorción de alimentos y agua y en las condiciones de supervivencia. Esto sugiere que la icaritina no tuvo efectos secundarios tóxicos significativos como agente antitumoral y fármaco para aliviar la supresión de la médula ósea.

Tabla 2. Efecto de la icaritina sobre los neutrófilos en los glóbulos blancos de los ratones con tumores.

Grupos	Muestra n.	Glóbulos blancos (10 ⁹ /L)	Neutrófilos (10 ⁹ /L)	Plaquetas (10 ⁹ /L)
Grupo de control modelo	10	2,831±0,32	1,128±0,18	508,3±38,6
Grupo de Docetaxel	10	2,773±0,46	0,670±0,12	450,6±30,5
Grupo de Tegafur	10	2,703±0,37	0,695±0,09	432,9±34,8
Grupo de icaritina	10	3,530±0,31 ^{###**\$\$}	1,316±0,15 ^{##**\$\$}	687,4±37,2 ^{##}
Grupo D + I	10	3,288±0,34 ^{#\$\$}	1,301±0,16 ^{##**\$\$}	598,7±25,8 ^{##}
Grupo T + I	10	2,895±0,43	1,076±0,20 ^{**\$\$}	623,1±27,9 ^{##**\$\$}

[#]P< 0,05, ^{##}P< 0,01, en comparación con el grupo de control modelo;
^{*}P< 0,05, ^{**}P< 0,01, en comparación con el grupo de docetaxel;
^{\$}P< 0,05, ^{\$\$}P< 0,01, en comparación con el grupo de tegafur.

A partir del experimento que muestra el efecto de la icaritina sobre la supresión de la médula ósea inducida por quimioterapia en los ratones con tumores en el presente ejemplo (tabla 2), se descubrió que en comparación con el grupo modelo, la cantidad de neutrófilos en los ratones en el grupo de docetaxel o el grupo de tegafur se redujo significativamente, mientras que la icaritina presentó un efecto inesperado de alivio de la supresión de la médula ósea. Específicamente, en comparación con el grupo modelo, la cantidad total de glóbulos blancos, la cantidad de plaquetas y la cantidad de neutrófilos en el grupo de icaritina aumentaron con una diferencia muy significativa (P< 0,01) o con una diferencia significativa (P< 0,05). Mientras tanto, en comparación con el grupo de docetaxel y el grupo de tegafur, la cantidad total de glóbulos blancos, la cantidad de plaquetas y la cantidad de neutrófilos de los ratones en el grupo de icaritina aumentaron drásticamente con una diferencia muy significativa (P< 0,01).

También se puede observar a partir de los resultados de las pruebas que cuando la icaritina, como agente anticancerígeno, se administró en combinación con docetaxel o tegafur, funcionó para inhibir el crecimiento tumoral y, al mismo tiempo, alivió la supresión de la médula ósea inducida por docetaxel o tegafur. En consecuencia, se puede administrar la icaritina al mismo tiempo que la quimioterapia con otros fármacos, y también se puede administrar profilácticamente, y no se puede administrar solo cuando se produce leucocitopenia. Fue capaz de promover la hematopoyesis de la médula ósea y aumentar las cantidades de glóbulos blancos y neutrófilos, al tiempo que garantiza la tasa de inhibición del tumor, y reduce los efectos secundarios en cierta medida.

Ejemplo 23: efecto de icaritina sobre la cantidad de células sanguíneas en ratones que reciben radiación de ⁶⁰Co

1. Materiales

1.1 Animales de prueba: ratones Kunming (adquiridos del Instituto Nacional Chino para el Control de Productos Farmacéuticos y Biológicos, Licencia de animal de laboratorio n.º: SCXK II-00-0010), la mitad machos y la otra mitad hembras, de 7 semanas, 18~22 g, temperatura de prueba (20±1) °C, humedad del 40 % ~ 70 %, libre acceso al agua, alimentación normal.

1.2 Reactivos de prueba:

reactivos de prueba	Fabricantes o fuentes
Microemulsión de icaritina	Se preparó de acuerdo con el proceso del ejemplo 1, pureza de la icaritina:
Formulación	99,3 %
Extracto de epimedio	El proceso de extracción, preparado de forma interna, se describe a continuación en la sección Método

2. Método:

los ratones de cada grupo, excepto el grupo normal (10 ratones) se irradiaron con 4 Gy de ⁶⁰Co mediante radiación sistémica de una vez con una dosis absorbida de 4 Gy y una tasa de dosis absorbida de 0,88 Gy/min. Se obtuvieron muestras de sangre en los días 3, 7 y 10 después de la radiación, respectivamente, de la vena orbital para el recuento de células sanguíneas completo. Se excluyeron los ratones cuya cantidad de glóbulos blancos fue inferior a 3,0×10⁹/L o cuya cantidad de plaquetas fue inferior a 500×10⁹/L en dos recuentos de células sanguíneas enteras consecutivos y se utilizaron los ratones restantes para ser evaluados.

Los ratones que cumplieron con los requisitos del experimento después de la radiación se dividieron aleatoriamente en el siguiente grupo control modelo, el grupo de extracto de epimedio y el grupo de icaritina, con 10 animales en cada grupo y la mitad machos y la otra mitad hembras. Se trató o se le administró a cada grupo lo siguiente.

- 5 Grupo 1, el grupo normal: se le administró por inyección intraperitoneal solución salina normal al 0,9 % en un volumen de administración de 10 ml/kg;
 Grupo 2, el grupo de control modelo: se le administró por inyección intraperitoneal solución salina normal al 0,9 % en un volumen de administración de 10 ml/kg;
 Grupo 3, el grupo de extracto de epimedio: se le administró por inyección intraperitoneal 3,5 ml/kg/d de extracto
 10 acuoso de epimedio;
 Grupo 4, el grupo de icaritina: se le administró por inyección intraperitoneal 10 mg/kg/d de icaritina en un volumen de administración de 10 ml/kg;

- El proceso de preparación del extracto de epimedio fue el siguiente: (1) se colocó epimedio en una olla, se le agregó
 15 agua nueva para sumergir el fármaco; (2) se sumergió durante 30 min para que los ingredientes activos en el epimedio se decocieran fácilmente; (3) se calentó rápidamente hasta un hervor suficiente durante 1-3 min, después se continuó calentando durante 20-30 min para concentrar el líquido, y se filtró el líquido en una taza a través de una gasa estéril; (4) se decoció el fármaco bien de una vez, y se mezcló bien la primera dosis con la segunda dosis para equilibrar la potencia del fármaco. Se prepararon 200 mL de extracto acuoso a partir de 1 kg de epimedio. Los
 20 extractos de epimedio empleados en los siguientes experimentos fueron todos preparados mediante este proceso.

- Cada grupo recibió una administración una vez al día durante un total de 10 días. Durante la prueba, se observó a los animales todos los días para controlar su ingesta de alimentos y agua, las condiciones de supervivencia y los comportamientos, y se midieron los pesos corporales todos los días. Después de la prueba, se obtuvieron muestras
 25 de sangre de la aorta abdominal para un análisis de sangre de rutina y se determinó la cantidad total de glóbulos blancos y la cantidad total de plaquetas.

3. Resultados experimentales:

- 30 Tabla 3: efecto de la icaritina sobre los glóbulos blancos y las plaquetas en ratones que recibieron 4 Gy de radiación de ^{60}Co

Grupos	Muestra n.	Glóbulos blancos ($10^9/\text{L}$)	Plaquetas ($10^9/\text{L}$)
Grupo normal	10	4,926±0,50	678,2±78,5
Grupo de control modelo	10	2,535±0,38	482,0±54,2
Grupo de extracto de epimedio	10	3,242±0,45	524,5±74,6
Grupo de icaritina	10	4,225±0,51 ^{##}	596,2±72,5 ^{##}
[#] $P < 0,05$, ^{##} $P < 0,01$, en comparación con el grupo de control modelo; ^{\$} $P < 0,05$, en comparación con el grupo de extracto de epimedio.			

- A través del experimento que mostró el efecto de la icaritina sobre los glóbulos blancos y las plaquetas en los ratones que recibieron 4 Gy de radiación de ^{60}Co en el presente ejemplo (tabla 3), se descubrió que la icaritina tuvo
 35 un efecto inesperado de aliviar la supresión de la médula ósea inducida por radioterapia. Específicamente, la cantidad total de glóbulos blancos y la cantidad total de plaquetas en el grupo de la icaritina aumentaron con una diferencia muy significativa ($P < 0,01$) o con una diferencia significativa ($P < 0,05$) en comparación con el grupo modelo; y con una diferencia significativa ($P < 0,05$) en comparación con el grupo del extracto de epimedio.

40 Ejemplo 24: efecto de icaritina sobre los glóbulos blancos y las plaquetas en ratones NOD

- Los ratones diabéticos no obesos (NOD, por sus siglas en inglés) son cepas de ratones grandes, que incluyen ratones NOD/Scid, NOD/Ltj, etc. Los ratones NOD/Ltj utilizados en este experimento son ratones con un sistema
 45 inmunitario anormal en los cuales las plaquetas y los glóbulos blancos evidentemente son inferiores que en los ratones normales.

1. Materiales

- 1.1 Animales de prueba: ratones NOD/Ltj (adquiridos de Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.,
 50 License of Laboratory Animal No.: SCXK (Jing) 2006-0009); hembra; de 5 semanas; 16~20 g, 52 ratones.

- 1.2 Reactivos de prueba:

interleucina, adquirida de Beijing Sino Biological Inc.
 Pentobarbital sódico, adquirido de Shanghai Kefeng Chemical Reagents Co., Ltd.
 Se preparó icaritina de acuerdo con el proceso del ejemplo 1, pureza de la icaritina: 99,3 %.

5 2. Agrupamiento y marcación:

Los ratones NOD sanos de 5 semanas, después de la alimentación adaptativa durante una semana, se dividieron aleatoriamente en 4 grupos:

- 10 El grupo I fue el grupo de control en blanco, 13 ratones en total; y se le administró intragástricamente solución salina normal en el mismo volumen de interleucina todos los días;
 El grupo II fue el grupo de control positivo, 13 ratones en total, y se le administraron intragástricamente 10,0 mg/kg de interleucina todos los días;
 El grupo III fue el grupo de icaritina de dosis baja, 13 ratones en total, y se le administraron intragástricamente 30 mg/kg de icaritina todos los días;
- 15 El grupo IV fue el grupo de icaritina de dosis alta, 13 ratones en total, y se le administraron intragástricamente 60 mg/kg de icaritina todos los días.

- 20 Cada grupo recibió una administración una vez al día durante 15 días consecutivos. Se anestesiaron los ratones (con pentobarbital sódico al 3 %, por inyección intraperitoneal, a 0,1~0,15 ml por animal). Se obtuvieron muestras de sangre de 1 ml de la aorta abdominal en un tubo anticoagulación para análisis de sangre de rutina.

Tabla 4: efecto de icaritina sobre los glóbulos blancos y las plaquetas en ratones NOD

Grupos	Muestra n.	Glóbulos blancos (10 ⁹ /L)	Plaquetas (10 ⁹ /L)
Grupo de control en blanco	13	2,535±0,38	508,3±38,6
Grupo de interleucina	13	2,683±0,35	524,5±74,6
Grupo de icaritina de dosis baja	13	3,242±0,45 [#] \$	730,5±34,6 ^{##} \$
Grupo de icaritina de dosis alta	13	4,225±0,51 ^{##} \$	780,2±46,5 ^{##} \$

[#]p < 0,05, ^{##}p < 0,01, en comparación con el grupo de control en blanco;
^{\$}p < 0,01, ^{\$\$}p < 0,01, en comparación con el grupo de interleucina.

- 25 Se puede observar a partir de la tabla 4 que la cantidad de glóbulos blancos y la cantidad de plaquetas en el grupo de icaritina de dosis alta y en el grupo de icaritina de dosis baja fueron significativamente mayores que las del grupo modelo, lo que indica un efecto terapéutico significativo. En comparación con la interleucina de control positivo antitrombocitopénica, la icaritina no sólo tuvo una ventaja significativa en el aumento de la cantidad de glóbulos blancos (p < 0,05), sino que también aumentó significativamente la cantidad de plaquetas, mejorando la
- 30 inmunocompetencia del cuerpo, especialmente para el grupo de icaritina de dosis alta, que mostró una ventaja muy significativa en el aumento de los glóbulos blancos y las plaquetas en comparación con los otros grupos.

Ejemplo 25: efecto de la icaritina sobre el tiempo de sangrado y el tiempo de coagulación en ratones normales (referencia)

35 25.1 Animales de prueba y fármacos de prueba:

Ratones Kunming, la mitad machos y la mitad hembras, 20±2,0 g de peso corporal; ratas Wistar, 200±20 g de peso corporal, la mitad machos y la mitad hembras. Los animales de prueba fueron proporcionados por New Drug
 40 Pharmacological Center of Shandong Xinshidai Medicine Industry Co., Ltd.

Fármacos de prueba: icaritina, preparada de acuerdo con el ejemplo 1; icariina, preparada a través del método del ejemplo 1 enCN101607976B, con una pureza del 98 %. La icariina empleada en los siguientes ejemplos se preparó del mismo modo que en este ejemplo.

45 25.2. Agrupamiento y administración

Se dividieron aleatoriamente 100 ratones Kunming en 5 grupos, es decir, el grupo de control en blanco (grupo de solución salina normal), el grupo de icariina (grupo de control positivo), el grupo de icaritina de dosis alta, el grupo de
 50 icaritina de dosis media y el grupo de icaritina de dosis baja. Se le administró a cada grupo lo siguiente.

Grupo de control en blanco: se le administró el mismo volumen de solución salina normal mediante inyección subcutánea;

Grupo de icariina: se le administraron 2 mg/kg de icariina mediante inyección;

Grupo de icaritina de dosis alta: se le administró la inyección de icaritina del ejemplo 1 mediante inyección subcutánea en una dosificación de 10 mg/kg;

5 Grupo de icaritina de dosis media: se le administró la inyección de icaritina del ejemplo 1 mediante inyección subcutánea en una dosificación de 5 mg/kg;

Grupo de icaritina de dosis baja: se le administró la inyección de icaritina del ejemplo 1 mediante inyección subcutánea en una dosificación de 1 mg/kg.

25.3 Mediciones del tiempo de sangrado y el tiempo de coagulación

10

Medición del tiempo de sangrado: El grupo de solución salina normal (grupo de control en blanco), el grupo de icariina (grupo de control positivo) y los grupos de administración de icaritina (grupos de dosis alta, media y baja) se diseñaron del siguiente modo: se seleccionaron 50 ratones, se pesaron y se dividieron aleatoriamente en 5 grupos, con 10 ratones en cada grupo. Los animales recibieron administraciones consecutivas durante 3 días. 1 h después

15

de la última administración, se enrolló un papel de filtro para formar un cartucho de papel de filtro con un diámetro similar al del cuerpo del ratón, que estaba cerrado en un extremo. Se permitió que el ratón se subiera al cartucho. Después, se cortaron aproximadamente 3 mm de la punta de la cola del ratón con tijera. Se inició un cronómetro para registrar la hora en que comenzó el sangrado. La punta de la cola del ratón se puso en contacto con un papel de filtro suavemente cada 15 s hasta que no hubo sangre o hasta que no se veía nada de sangre. El tiempo

20

registrado fue el tiempo de sangrado, y los resultados se muestran en la tabla 5.

Medición del tiempo de coagulación: El grupo de solución salina normal (grupo de control en blanco), el grupo de icariina (grupo de control positivo) y los grupos de administración de icaritina (grupos de dosis alta, media y baja) se diseñaron del siguiente modo: se seleccionaron 50 ratones, se pesaron y se dividieron aleatoriamente en 5 grupos,

25

con 10 ratones en cada grupo. Los animales recibieron administraciones consecutivas durante 3 días. 1 h después de la última administración, se tomaron muestras de sangre del plexo venoso mediante la inserción de un tubo de recolección de sangre desechable de 20 µl en el canto interno del ratón para recoger 20 µl de sangre. Se rompió un pequeño fragmento de capilar cada 15 s para comprobar la presencia de filamentos coagulantes. Se registró el tiempo transcurrido desde la toma de la muestra de sangre hasta la aparición de filamentos de proteínas fibrosas

30

(tiempo de coagulación), y los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de las mediciones del tiempo de sangrado y el tiempo de coagulación

Grupos	n	Dosificación	Tiempo de sangrado	Tiempo de coagulación
Grupo de control en blanco	10	-	5,11±0,62	5,68±0,72
Grupo de icariina	10	2 mg/kg	4,03±0,45	4,28±0,61
Grupo de icaritina de dosis alta	10	10 mg/kg	1,86±0,24 ^{△△}	1,96±0,16 ^{△△}
Grupo de icaritina de dosis media	10	5 mg/kg	2,51±0,35 [△]	3,04±0,31 [△]
Grupo de icaritina de dosis baja	10	1 mg/kg	3,75±0,46	3,84±0,55

Nota: P < 0,05, **P < 0,01, en comparación con el grupo de control en blanco;△P < 0,05,△△P < 0,01, en comparación con el grupo de icariina.

Como se puede observar a partir de la tabla 5, los grupos de administración de icaritina y el grupo de icariina mostraron reducción en el tiempo de sangrado y el tiempo de coagulación en ratones normales, en donde cada uno de los grupos de administración de icaritina fue superior al grupo de icariina en la disminución del tiempo de sangrado y el tiempo de coagulación en los ratones normales, y la icaritina mostró dependencia de la dosis en la disminución del tiempo de sangrado y el tiempo de coagulación en los ratones normales, y el grupo de icaritina de dosis alta y el grupo de icaritina de dosis media mostraron una diferencia significativa en comparación con el grupo de icariina.

40

Ejemplo 26: efecto de icaritina sobre la cantidad de plaquetas en el modelo de ITP

26.1 Preparación del modelo, agrupamiento y administración

45

Establecimiento del modelo de ITP crónica: Se seleccionaron ratas Wistar para establecer el modelo mediante la inyección de suero plaquetario anti-ratas de conejo (APS). Se le inyectó por vía intraperitoneal a la rata APS diluido

1:4 (0,7 ml/200 g de peso corporal) durante 3 días consecutivos, lo que puede reducir significativamente la cantidad de plaquetas. Se seleccionaron 50 ratas en las cuales el modelo se estableció con éxito, se pesaron y se dividieron aleatoriamente en 5 grupos, es decir, el grupo de control modelo, el grupo de icariina (grupo de control positivo) y los grupos de administración de icaritina (grupos de dosis alta, media y baja), con 10 ratas en cada grupo. A los grupos

5 se les administraron los siguientes agentes terapéuticos, respectivamente.

El grupo de control modelo: se le administró mediante inyección subcutánea el mismo volumen de solución salina normal;

El grupo de icariina: se le administraron mediante inyección subcutánea 2 mg/kg de icariina;

10 El grupo de icaritina de dosis alta: se le administraron mediante inyección subcutánea 10 mg/kg de la inyección de icaritina del ejemplo 11;

El grupo de icaritina de dosis media: se le administraron mediante inyección subcutánea 5 mg/kg de la inyección de icaritina del ejemplo 11;

El grupo de icaritina de dosis baja: se le administraron mediante inyección subcutánea 1 mg/kg de la inyección de icaritina del ejemplo 11.

15

26.2 Recuento de plaquetas en ratas de los grupos de administración

1 h después de la última administración, se tomaron muestras de sangre del plexo venoso mediante la inserción de un tubo de recolección de sangre desechable de 20 µl en el canto interno del ratón. Se determinó la cantidad total de

20 plaquetas en la rata, y los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados del recuento de plaquetas en cada grupo de ratas

Grupos	n	Dosificación	Recuento de plaquetas ($\times 10^9$)
Grupo de control modelo	10	-	423,6 \pm 52,4
Grupo de icariina	10	2 mg/kg	571,8 \pm 60,6
Grupo de icaritina de dosis alta	10	10 mg/kg	819,96 \pm 61,8 ^{**} $\Delta\Delta$
Grupo de icaritina de dosis media	10	5 mg/kg	720,4 \pm 60,3 [*] Δ
Grupo de icaritina de dosis baja	10	1 mg/kg	680,84 \pm 50,5 [*]

Nota: P < 0,05, ^{**}P < 0,01, en comparación con el grupo de control modelo; ^{\Delta}P < 0,05, ^{\Delta\Delta}P < 0,01, en comparación con el grupo de icariina.

Como se puede observar a partir de la tabla 6, los grupos de administración de icaritina y el grupo de icariina pueden

25 aumentar la cantidad de plaquetas en ratas con ITP, en donde cada uno de los grupos de administración de icaritina fue superior al grupo de icariina en el aumento de la cantidad de plaquetas en las ratas con ITP, la icaritina mostró dependencia de la dosis en el aumento de la cantidad de plaquetas en ratas con ITP, y el grupo de icaritina de dosis alta y el grupo de icaritina de dosis media mostraron una diferencia significativa en comparación con el grupo de icariina.

30

En resumen, la icaritina puede mostrar un efecto terapéutico positivo en las ratas del modelo de ITP crónica, y fue superior al control positivo, la icariina, en la disminución del tiempo de trombina, el tiempo de protrombina y el tiempo parcial de tromboplastina, y en el aumento de la cantidad de plaquetas en las ratas del modelo de ITP crónica. Los grupos de dosis altas y medias pueden acortar significativamente el tiempo de trombina (TT), el tiempo de

35 protrombina (PT) y el tiempo parcial de tromboplastina (APTT) en las ratas del modelo de ITP crónica (P < 0,05), y tuvieron un efecto muy significativo en el aumento de la cantidad de plaquetas en las ratas (P < 0,01). Por consiguiente, la composición de la medicina tradicional china de la presente solicitud se puede utilizar para tratar la trombocitopenia, especialmente para tratar la trombocitopenia inmunitaria.

40 Ejemplo 27: efecto de la icaritina sobre la trombocitopenia inmunitaria activa en ratones

27.1 Preparación del modelo, agrupamiento y administración

Se seleccionaron 72 ratones Balb/C, se pesaron y se dividieron aleatoriamente en 5 grupos de administración, es

45 decir, el grupo normal, el grupo de control modelo, el grupo de icariina (grupo de control positivo) y los grupos de administración de icaritina (grupos de dosis alta, media y baja), con 12 ratones en cada grupo. Se inyectó por vía intraperitoneal a los ratones Balb/C de cada grupo, excepto el grupo normal, con plaquetas de ratas SD una vez por semana durante tres veces consecutivas, lo que puede reducir significativamente la cantidad de plaquetas. En el

50

El grupo normal: se le administró por vía intragástrica el mismo volumen de solución salina normal;

El grupo de control modelo: se le administró por vía intragástrica el mismo volumen de solución salina normal;
 El grupo de icaritina: se le administraron por vía intragástrica 20 mg/kg de icariina;
 El grupo de icaritina de dosis alta: se le administraron por vía intragástrica 100 mg/kg de los comprimidos de icaritina del ejemplo 9;

5 El grupo de icaritina de dosis media: se le administraron por vía intragástrica 50 mg/kg de los comprimidos de icaritina del ejemplo 9;

El grupo de icaritina de dosis baja: se le administraron por vía intragástrica 10 mg/kg de los comprimidos de icaritina del ejemplo 9.

10 Cada uno de los grupos de administración recibía una administración una vez al día y alimentación normal. Después de establecer el modelo tres veces, se continuó con la administración de cada grupo de administración durante una semana. Los ratones fueron anestesiados y se tomaron muestras de sangre para medir la cantidad de plaquetas y determinar el efecto de la icaritina sobre la cantidad de plaquetas (PLT) en la sangre periférica.

15 27.2 Resultados experimentales

Los resultados para determinar el efecto de la icaritina sobre la cantidad de plaquetas (PLT) en la sangre periférica se muestran en la tabla 7.

20 Tabla 7: efecto de la icaritina sobre la trombocitopenia inmunitaria activa en ratones

Grupos	n	Dosificaciones	PLT ($10^9/L$, $x\pm s$)
Grupo de control normal	12	-	1213,6 \pm 107,6
Grupo de control modelo	12	-	603,3 \pm 72,1 [#]
Grupo de icariina	12	2 mg/kg	850,6 \pm 90,1 ^{**}
Grupo de icaritina de dosis alta	12	100 mg/kg	1193,4 \pm 95,4
Grupo de icaritina de dosis media	12	50 mg/kg	983,5 \pm 85,7
Grupo de icaritina de dosis baja	12	10 mg/kg	862,7 \pm 75,6

#: $p < 0,05$ en comparación con el grupo de control normal; **: $p < 0,01$ en comparación con el grupo de control modelo.

Tal como se puede observar a partir de la tabla 7, los grupos con administración de icaritina y el grupo de icariina mostraron ambos efectos terapéuticos positivos sobre la trombocitopenia inmunitaria activa en ratones, y puede aumentar la cantidad de plaquetas en la trombocitopenia inmunitaria activa en ratones, donde cada uno de los

25 grupos de administración de icaritina fue superior al grupo de icariina en el aumento de la cantidad de plaquetas en el modelo de trombocitopenia inmunitaria activa en ratones, y la icaritina mostró dependencia de la dosis en el aumento de la cantidad de plaquetas en el modelo de ratones de trombocitopenia inmunitaria activa, y el grupo de icaritina de dosis alta y el grupo de icaritina de dosis media muestran una diferencia significativa en comparación con el grupo de icariina.

30

Ejemplo 28: efecto de la icaritina sobre la trombocitopenia inducida por ciclofosfamida en ratones

Se seleccionaron 72 ratones Balb/C, se pesaron y se dividieron aleatoriamente en 6 grupos, es decir, el grupo normal, el grupo de control modelo, el grupo de icariina (grupo de control positivo) y los grupos de administración de icaritina (grupos de dosis alta, media y baja), con 12 ratones en cada grupo. Se inyectaron a los ratones por vía intraperitoneal 50 mg/kg de ciclofosfamida todos los días durante una semana consecutiva, lo que puede reducir significativamente la cantidad de plaquetas. Una semana antes de comenzar a establecer el modelo, a cada grupo se le administraron los siguientes agentes terapéuticos:

40 El grupo normal: se le administró por vía subcutánea el mismo volumen de solución salina normal;
 El grupo de control modelo: se le administró por vía subcutánea el mismo volumen de solución salina normal;
 El grupo de icariina: se le administraron mediante inyección subcutánea 2 mg/kg de icariina;
 El grupo de icaritina de dosis alta: se le administraron mediante inyección subcutánea 10 mg/kg de la inyección de icaritina del ejemplo 11;

45 El grupo de icaritina de dosis media: se le administraron mediante inyección subcutánea 5 mg/kg de la inyección de icaritina del ejemplo 11;
 El grupo de icaritina de dosis baja: se le administraron mediante inyección subcutánea 1 mg/kg de la inyección de icaritina del ejemplo 11.

50 Cada grupo recibía una administración una vez al día y alimentación normal. Después de una administración consecutiva durante 3 semanas, los ratones fueron anestesiados y se tomaron muestras de sangre para medir la

cantidad de plaquetas y determinar el efecto de la icaritina sobre la cantidad de plaquetas (PLT) en la sangre periférica. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: efecto de la icaritina sobre la trombocitopenia inducida por ciclofosfamida en ratones

Grupos	n	Dosificaciones	PLT ($10^9/L$, $x \pm s$)
Grupo de control normal	12	---	1113,6 \pm 107,6
Grupo de control modelo	12	---	303,3 \pm 72,1 [#]
Grupo de icariina	12	2 mg/kg	550,6 \pm 90,1 ^{**}
Grupo de icaritina de dosis alta	12	10 mg/kg	894,6,4 \pm 82,4
Grupo de icaritina de dosis media	12	5 mg/kg	725,9 \pm 66,7
Grupo de icaritina de dosis baja	12	1 mg/kg	633,5 \pm 43,2
#: p < 0,05 en comparación con el grupo de control normal; **: p < 0,01 en comparación con el grupo de control modelo.			

5

Tal como se puede observar a partir de la tabla 8, los grupos con administración de icaritina y el grupo de icariina mostraron un efecto terapéutico positivo sobre la trombocitopenia inducida por ciclofosfamida en ratones, y puede aumentar la cantidad de plaquetas en el modelo de trombocitopenia inducida por ciclofosfamida en ratones, donde cada uno de los grupos de administración de icaritina fue superior al grupo de icariina en el aumento de la cantidad de plaquetas en el modelo de trombocitopenia inducida por ciclofosfamida en ratones, y la icaritina mostró dependencia de la dosis en el aumento de la cantidad de plaquetas en el modelo de trombocitopenia inducida por ciclofosfamida en ratones, y el grupo de icaritina de dosis alta y el grupo de icaritina de dosis media muestran una diferencia significativa en comparación con el grupo de icariina.

10

REIVINDICACIONES

1. Icaritina para uso como un medicamento para prevenir o tratar la hematocitopenia, donde la hematocitopenia se selecciona de la supresión de la médula ósea inducida por radiación o un químico,
5 trombocitopenia secundaria inducida por supresión de la médula ósea debido a la radiación o a un fármaco químico, o trombocitopenia inmunitaria, **caracterizada porque** la hematocitopenia es una reducción de los glóbulos blancos o plaquetas en la sangre periférica.
2. Icaritina para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** el químico es un
10 fármaco quimioterapéutico para tratar el cáncer.
3. Icaritina para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada porque** el fármaco quimioterapéutico para tratar el cáncer es docetaxel o tegafur.
- 15 4. Icaritina para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** la trombocitopenia inmunitaria es púrpura trombocitopénica idiopática crónica.
5. Icaritina para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** el fármaco químico es docetaxel, ciclofosfamida o tegafur.
20
6. Icaritina para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, **caracterizada porque** el medicamento es una formulación oral o una formulación para administración parenteral, como una inyección.
7. Icaritina para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada porque** la formulación oral es
25 un comprimido, gránulo o cápsula.
8. Icaritina para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada porque** la formulación oral o la inyección contiene icaritina en una cantidad de entre 0,1 y 500 mg por dosis unitaria.
- 30 9. Icaritina para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, **caracterizada porque**, cuando la icaritina se administra por vía oral a un ser humano, la dosificación es de entre 0,1 mg/kg/d y 100 mg/kg/d, y cuando la icaritina se administra a un ser humano mediante inyección, la dosificación es de entre 0,01 mg/kg y 10 mg/kg.
- 35 10. Icaritina para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, **caracterizada porque** el medicamento se encuentra en forma de un sólido, líquido, aceite, emulsión, gel, aerosol, inhalante, pulverizador, cápsula, píldora, parche o supositorio.
11. Icaritina para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, **caracterizada porque** la
40 icaritina se administra en combinación con uno o más fármacos diferentes para tratar la leucocitopenia o uno o más fármacos diferentes que son capaces de aumentar la cantidad de plaquetas, donde los fármacos para tratar la leucocitopenia se seleccionan de vitamina B4, leucógeno, alcohol batílico y coenzima A, y los fármacos que son capaces de aumentar la cantidad de plaquetas se seleccionan de interleucina-II y glucocorticoides como prednisona.