

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 987**

51 Int. Cl.:

A61K 36/81 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2008 PCT/EP2008/003191**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2009 WO09129818**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2008 E 08735341 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2265277**

54 Título: **Preparación y uso de un extracto de planta a partir de Solanum Glaucophyllum con un contenido enriquecido de glucósidos de 1,25-dihidroxivitamina D₃ y glucósidos de quercetina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2019

73 Titular/es:
HERBONIS AG (100.0%)
Rheinstrasse 30
4302 Augst, CH

72 Inventor/es:
AUTZEN, SABRINA y
BACHMANN, HEINRICH

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 702 987 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

Preparación y uso de un extracto de planta a partir de *Solanum Glaucophyllum* con un contenido enriquecido de glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ y glucósidos de quercetina

5 La presente invención se refiere a la preparación de un extracto de planta enriquecido y equilibrado de *Solanum glaucophyllum* con un contenido enriquecido de glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ y flavonoles, específicamente, glucósidos de quercetina. Particularmente, la presente invención describe un método para preparar un extracto de planta de este tipo tanto a escala industrial como a escala de laboratorio. Además, la presente invención describe el uso de un extracto de planta de este tipo para prevenir y tratar enfermedades relacionadas con la reducción de masa ósea, tales como osteopenia u osteoporosis, para la prevención y tratamiento de discondroplasia tibial, preferiblemente en aves de corral, para tratar la fiebre de la leche, y como suplemento dietético.

15 Los huesos sanos están en un delicado equilibrio de procesos de resorción ósea y formación ósea para adaptar el esqueleto a las demandas cambiantes durante toda la vida de un individuo. Esto permite que el esqueleto crezca durante la infancia, tal como se visualiza por crecimiento del cráneo, donde los minerales se depositan en el lado externo y el hueso se reabsorbe en el lado interno, lo que deja espacio para el crecimiento del cerebro. Durante la edad adulta, los huesos se pueden reforzar por sí mismos para adaptarse a las cargas cuando se realiza deporte o se cargan objetos pesados. El remodelado óseo es un proceso con una secuencia típica: los osteoclastos que reabsorben huesos se acoplan a la superficie de un área distinta y comienzan a reabsorber material óseo. Como resultado, se forman lacunae u orificios. Sobre los orificios de este tipo, se agregan osteoblastos que forman huesos y estas células depositan nuevo material óseo. Al final de un ciclo de este tipo, queda una región con una estructura ósea más fuerte. Sin embargo, a edades avanzadas o en mujeres posmenopáusicas, el equilibrio cambia hacia una pérdida ósea neta. La pérdida ósea sucede también durante largos periodos de reposo en cama o en condiciones de gravedad reducida. Tal como ilustra la Figura 1, la masa ósea alcanza el pico máximo en la mediana edad y luego desciende lentamente. En las mujeres en riesgo, la pérdida ósea acelerada sucede después de la menopausia cuando se detiene la producción de la hormona estrógeno. Una pérdida ósea de este tipo se diagnostica típicamente como osteoporosis u osteopenia (la forma previa más leve), donde la enfermedad de la osteoporosis se ha convertido en un problema de salud importante en poblaciones con esperanzas de vida aumentadas, particularmente, en civilizaciones occidentales.

30 No solo en los seres humanos, también los animales padecen enfermedades o formación ósea alterada, tanto en animales con edades avanzadas como en jóvenes durante periodos de crecimiento intensivo. Como ejemplo, en animales, particularmente en animales de crecimiento rápido y productores de alimentos, tales como aves de corral, la debilidad en las patas y, como consecuencia, discondroplasia tibial (DT), es un problema importante que provoca pérdidas y calidad inferior de la carne. También, debido al bienestar del animal, se ha evitado el problema de discondroplasia tibial (véase la publicación *Poultry Leg Problem. Rath NC, USDA/ARS, Poultry Production and Product Safety Research, Poultry Science Center, Universidad de Arkansas, EE. UU. (09/04/2003)*). Además, las gallinas ponedoras tienen un recambio enorme de calcio debido a su producción de cáscaras de huevo. Cada día, aproximadamente una décima parte de la reserva de calcio del animal se absorbe de la nutrición, se almacena en los huesos y se moviliza en unas pocas horas durante la producción de la cáscara alrededor del huevo. Por lo tanto, un suministro subóptimo de vitamina D puede provocar también osteoporosis en gallinas ponedoras.

40 Muchos planteamientos se han propuesto y se han seguido para prevenir la pérdida ósea posmenopáusica y relacionada con la edad, donde, por ejemplo, el entrenamiento físico y el tratamiento farmacéutico son métodos de elección para la terapia de la osteoporosis. En la actualidad, el tratamiento farmacéutico/tratamiento farmacológico sigue típicamente un planteamiento terapéutico o curativo, donde la terapia empieza cuando el estado patológico ya se ha diagnosticado, es decir, cuando la masa ósea o la densidad ósea han caído a un cierto nivel mínimo de masa ósea o densidad ósea necesarias, o, en el peor de los casos, cuando ya ha sucedido una fractura. De este modo, la prevención de una producción insuficiente de un mínimo de masa ósea y densidad ósea necesarias sería más preferible a la terapia, pero debería empezar cuando la densidad ósea esté aún en un nivel alto y debe llevarse a cabo durante un periodo de tiempo largo, por ejemplo, tal como se ilustra en la Figura 1. De esta manera, los tratamientos que admiten mecanismos fisiológicos y que son de origen natural pueden ser una alternativa valiosa para un tratamiento curativo con fármacos sintéticos.

55 Por el momento, los fármacos antiosteoporóticos se pueden clasificar típicamente según su modo de acción en agentes antirresortivos, hormonas anabólicas o esteroides, agentes formadores de hueso y otros, respectivamente. Alternativamente o adicionalmente, los fármacos antiosteoporóticos se pueden clasificar según sus estructuras químicas, que siguen típicamente uno de los anteriores modos de acción. Los fármacos antiosteoporóticos conocidos incluyen, por ejemplo, grupos bisfosfonato, estrógenos sintéticos, vitamina D y sus metabolitos, etc.

60 En la actualidad, los fármacos más prescritos pertenecen al grupo bisfosfonato, que actúan en los osteoblastos que reabsorben huesos y, de esta manera, reducen la resorción ósea (véase, por ejemplo, Fleisch H. *et al.*, *Endocrine Reviews* (1998)19(1): 80-100 Bisphosphonates: Mechanisms of Action). Una desventaja del tratamiento con fármacos del grupo bisfosfonato es el bloqueo del recambio óseo y, por lo tanto, una reducción del remodelado óseo.

Tal como evidencia la fuerte pérdida de masa ósea después de la menopausia, las hormonas sexuales femeninas poseen también un potente efecto en el hueso. Por lo tanto, la terapia hormonal sustitutiva con estrógenos sintéticos puede representar un tratamiento efectivo de la osteoporosis. Un tratamiento de este tipo, sin embargo, se limita a las mujeres y ya no se recomienda en la actualidad debido a que un gran estudio clínico mostró una incidencia aumentada de cáncer de mama como reacción adversa.

Un planteamiento adicional, más fisiológico y, por lo tanto, más prometedor es el apoyo de la regulación del calcio y, por lo tanto, del umbral mineral óseo natural del paciente que se va a tratar, tanto como prevención o como terapia de las enfermedades anteriores.

Existen muchos factores, los cuales están involucrados en la regulación del calcio y del umbral mineral óseo natural. Los agentes que actúan en la homeostasis del calcio, por ejemplo, hormonas, tales como las hormonas calcitonina u hormona paratiroidea y derivados sintéticos de estas. Sin embargo, las hormonas peptídicas de este tipo no se pueden administrar por vía oral, sino que necesitan que se administren por inyección o por un pulverizador nasal, y, por lo tanto, no permiten una administración fácil de los fármacos al paciente que los necesita.

El factor más importante en la regulación del calcio en animales y seres humanos, incluido el umbral mineral óseo natural, involucra calcio, típicamente en forma de una sal preferiblemente soluble o como Ca^{2+} . Además de lo anterior, el calcio representa un agente clave en la señalización intracelular, la transmisión del impulso nervioso y la contracción muscular (Cashman *et al.*, Novartis Found Symp. 2007, 282:123-38, discussion 138-42, 212-8; and Parfitt AM. Bone. 1987, 8 Suppl. 1: S1-8). La provisión insuficiente de calcio al cuerpo humano o animal puede provocar de este modo concentraciones que dan como resultado una producción insuficiente de un mínimo de masa ósea y densidad ósea necesarias. Por otro lado, sin una regulación eficaz, el contenido de calcio en el cuerpo humano o animal podría alcanzar concentraciones demasiado altas que interfieran en la señalización intracelular, en la transmisión del impulso nervioso y en la contracción muscular, o que podrían provocar efectos secundarios tóxicos. Por lo tanto, en todos los animales de sangre caliente, un sistema de regulación ajustado previene que el cuerpo tenga concentraciones de calcio tóxicas.

Un componente principal adicional de la regulación del calcio en el umbral mineral óseo natural es la vitamina D. La vitamina D es un nutriente esencial para desarrollo óseo óptimo tal como se ha visto en la prevención y curación del raquitismo, donde derivados naturales y no naturales de metabolitos de vitamina D se conocen por ser utilizados. Sin embargo, la vitamina D que existe de manera natural en forma de colecalciferol (vitamina D_3) o ergocalciferol (vitamina D_2) no es biológicamente activa. Por consiguiente, la vitamina D que existe de manera natural no es capaz de curar enfermedades óseas de desarrollo lento tales como osteoporosis, tal como se ha expuesto en una conferencia de consenso (Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. NIH Consensus Statement Online 2000 Marzo 27-29; 17(1): 1-36.). Esto se debe al hecho de que la vitamina D que existe de manera natural requiere dos etapas de conversión para activarse, donde la segunda etapa se regula de manera ajustada. Según una primera etapa, después de la formación en la piel o la absorción por ingestión, el colecalciferol (vitamina D_3) se convierte en el hígado de un hombre o animal en su forma de almacenamiento 25-hidroxitamina D_3 (también abreviada como $25(\text{OH})\text{D}_3$). Un almacenamiento de vitamina D_3 completo protege a una persona durante 2 o 3 meses contra el raquitismo. Sin embargo, la forma de almacenamiento aún no es biológicamente activa, necesita activarse en una segunda etapa a la forma activa de vitamina D_3 , es decir, 1,25-dihidroxitamina D_3 (también abreviada como $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, calcitriol) por una enzima hepática. La forma activa 1,25-dihidroxitamina D_3 activa entonces un producto génico en el tejido sensible. En el intestino este es la calbidina, la proteína de unión al calcio que es capaz finalmente de absorber el calcio de la comida. Además, el metabolito activo así formado 1,25-dihidroxitamina D_3 controla la absorción de calcio en el tubo digestivo y su deposición en y movilización desde el hueso.

No obstante, los mecanismos de control naturales de este tipo no provocan con mucha frecuencia una concentración suficiente del metabolito activo en el cuerpo humano o animal para prevenir las enfermedades óseas de desarrollo lento tales como osteoporosis, particularmente a edades avanzadas, o para prevenir enfermedades en animales, tales como discondroplasia tibial en aves de corral.

Desde el primer descubrimiento del principio activo, varios planteamientos han empezado a proporcionar vitamina D_3 para su uso en medicina, ya que la vitamina D_3 no está presente de manera abundante en la nutrición, solo los aceites marinos contienen cantidades sustanciales. La provisión de vitamina D_3 o sus metabolitos, representa así una base esencial y también un aspecto desafiante en una terapia eficaz de cualquiera de las enfermedades mencionadas anteriormente. Por ejemplo, el documento US 5.508.392 describe el uso de glucósidos de vitamina D_3 sintética, glucósidos de ortoéster de vitamina D_3 , glucósidos análogos de vitamina D_3 y glucósidos de ortoéster análogos de vitamina D_3 para el tratamiento de la osteoporosis.

Un inconveniente negativo de la administración de vitamina D_3 y sus análogos sintéticos es el margen terapéutico particularmente estrecho para la medicación y el riesgo de hipercalcemia, es decir, una alta concentración anormal y tóxica de calcio en la sangre, que puede causar con el tiempo daños graves en los tejidos blandos y riñones. Puede ser causada por intoxicación con vitamina D_3 (hipervitaminosis D_3) debido a las sobredosis en más de 100 veces (de) la cantidad diaria recomendada. En particular, se conoce un inconveniente esencial de este tipo para la 1,25-dihidroxitamina D_3 , donde un pequeño margen para la medicación se abre en el intervalo entre la dosis eficaz y la dosis con la que comienzan los efectos secundarios tóxicos, cuya tasa es de solo 2 a 5. Como ejemplo, un efecto

adverso mensurable de altas dosis de 1,25-dihidroxitamina D₃ se ha observado en la producción de aves de corral que provoca aumento de peso extraordinariamente bajo. Sin embargo, a pesar del inconveniente mencionado anteriormente, la vitamina D₃ y sus análogos todavía parecen ser un compuesto atractivo para su uso en cualquiera de las terapias anteriores.

- 5 No obstante, que una terapia sea adecuada depende también de otros factores, por ejemplo, en los costes de preparar los compuestos activos utilizados en esta. El cuello de botella para una terapia rentable de las enfermedades mencionadas anteriormente utilizando vitamina D₃ o sus análogos es, en consecuencia, una provisión o preparación barata de metabolitos de vitamina D.

10 Según una posibilidad, los metabolitos de vitamina D se pueden proporcionar por una síntesis estereoselectiva química. Desafortunadamente, la síntesis estereoselectiva es típicamente una labor intensiva y requiere de muchas etapas de síntesis y purificación para obtener formas enantioméricamente enriquecidas o incluso puras de una vitamina D₃ o sus metabolitos. Por consiguiente, la síntesis estereoselectiva de vitamina D es cara y no permite una terapia rentable de cualquiera de las enfermedades mencionadas anteriormente en el presente escenario, incluso aunque muchos medicamentos con vitamina D₃ sintética se admiten y se prescriben con frecuencia. Además, la
15 1,25-dihidroxitamina D₃ producida sintéticamente, administrada a concentraciones altas, tiene el inconveniente mencionado anteriormente de un margen terapéutico particularmente estrecho para la medicación y conlleva el riesgo de hipercalcemia. De este modo, se pueden preferir otras fuentes para proporcionar vitamina D₃ o sus metabolitos.

20 Aun así, fue una sorpresa cuando se descubrió que los extractos de planta contienen metabolitos de vitamina D en grandes cantidades. Las plantas de este tipo incluyen, por ejemplo, especies de la familia *Solanaceae* (hierbas solanáceas), particularmente *Solanum glaucophyllum* (también denominada *Solanum malacoxylon* o *Solanum glaucum*), *Solanum torvum*, *Solanum esuriale*, *Solanum verbascifolium*, *Cestrum diurnum*, etc., la especie *Nierembergia veichtii*, y las especies de la familia *Gramineae*, particularmente *Trisetum flavescens*, etc. Una investigación intensiva en las últimas décadas ha revelado además que las hojas de las tomateras (*Lycopersicon
25 esculentum* de la familia *Solanaceae*) muestran una cierta cantidad de vitamina D₃ en forma de glucósidos de 25(OH)D₃ y 1,25(OH)₂D₃ (Prema y Rhagamulu, 1996, *Phytochem.* 42(3), 617-620). De manera similar, las plantas de la patata (*Solanum tuberosum*), las plantas de la berenjena (*Solanum melongena*) y las plantas del calabacín (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo* convar. *giromontina*) (véase, por ejemplo, Aburjaj *et al.* 1998, *Phytochem.* 46(6), 1005-1018) al igual que la *Nicotiana glauca* (tabaco moruno de la familia *Solanaceae*) (Skliar *et al.*, 2000, *Plant
30 Science* 156, 193-199) han mostrado una considerable cantidad de vitamina D. De este modo, potencialmente existen plantas que pueden servir como base para proporcionar vitamina D o sus metabolitos.

La base de este descubrimiento fue la aparición de efectos beneficiosos después de alimentar a animales con hojas u otras partes de estas plantas. Se han publicado varios de estos efectos beneficiosos de hojas secas de plantas calcinogénicas de este tipo (véase, por ejemplo, Boland *et al.*, *Plant Science* 00, 1-13 (2003)). También, algunas
35 aplicaciones han descrito el uso de extractos a partir de estas plantas. Por ejemplo, el documento US 5,776,461 describe composiciones cosméticas que contienen fitovitamina D, particularmente composiciones naturales para el cuidado de la piel que contienen compuestos de vitamina D hidroxilados seleccionados o sus glucósidos, que derivan de fuentes vegetales (fitovitaminas D).

Una planta con las mayores concentraciones de vitamina D resultó ser la *Solanum glaucophyllum*. En particular, se
40 ha descubierto que *Solanum glaucophyllum*, anteriormente conocida como *Solanum malacoxylon*, contiene vitamina D. En partes de la especie *Solanum glaucophyllum*, el componente activo se identificó como el metabolito de vitamina D₃ 1,25-dihidroxitamina D₃ (véase, por ejemplo, De Vernejoul *et al.*, *La Nouvelle Presse medicale*, 7, 22, 1941-43 (1978)).

Mientras existe bibliografía extensa sobre los componentes activos de la vitamina D en *Solanum glaucophyllum*, se
45 conoce muy poco sobre otros componentes de la planta. Solamente una publicación describe la presencia del alcaloide solasodina en la planta (véase Jain and Sahoo, *Pharmazie* (1986) 41:820-821) y una publicación describe la presencia de compuestos fenólicos, sin embargo, no ofrece porciones cuantitativas de estos compuestos (Rappaport *et al.*, *Phytochemistry* (1977) 16:1115-6). Aparte de su principal componente, 1,25-dihidroxitamina D₃, se ha encontrado en *Solanum glaucophyllum* una serie de glucósidos fenólicos por extracción con butanol de la
50 planta incluidos hidroquinona, kaempferol y quercetina y los siguientes glucósidos conocidos arbutina, O-metil-arbutina, isoquercetina, avicularina, rutina, kaempferol-3-O-rutinósido e isorhamnetina-3-O-rutinósido. Un nuevo triósido de quercetina, el compuesto 3-O-[2G-b-D-aposil]rutinósido de quercetina se ha encontrado también en *Solanum glaucophyllum*. Muchos de estos compuestos fenólicos son constituyentes de todas las plantas y no se ofreció el contenido cuantitativo en la publicación de Rappaport *et al.* (1977, supra). Además, los flavonoides, una
55 subclase de fenoles vegetales, típicamente se tratan como antioxidantes, mientras que no se ha mostrado o tratado una actividad positiva en la formación ósea. Asimismo, solo se ha descrito un efecto en las células óseas para flavonoles (la subclase fenólica vegetal) (quercetina y kaempferol). Por ejemplo, experimentos *in vitro* recientes indican una inhibición de formación de osteoclastos y diferenciación de células precursoras osteoclasticas por quercetina y rutina. Yamaguchi encontró un potente efecto inhibidor en la osteoclastogénesis y en la resorción ósea
60 en vez de en la formación ósea *in vitro* por quercetina y kaempferol (Yamaguchi *et al.*, *Mol Cell Biochem.* 2007 Jun 1). A nivel genómico, la quercetina y sus glucurónidos fomentan un aumento del nivel de ARNm de la sialoproteína

ósea (Kim *et al.*, J Cell Biochem. 2007 Jun 1). Otros estudios *in vitro* en células de la línea osteoclástica confirmaron un efector inhibidor en la diferenciación de osteocastos, una etapa determinante en la resorción ósea, pero no mostró un efecto positivo en la formación ósea (Wattel *et al.*, J Cell Biochem. 2004 Mayo 15; 92(2):285-95).

5 En un nivel superior, experimentos en cultivos de órganos osículos (Sziklai and Ribári, Acta Otolaryngol. 1995 Mar;115(2):296-9) y en células osteoblásticas de calvaria de rata (Yang *et al.*, Zhong Yao Cai. 2006 May;29(5):467-70) también mostraron un efecto inhibidor de quercetina en células osteoblásticas. Además, en dos estudios con animales intactos, la quercetina fue eficaz en el metabolismo mineral óseo, fuerza biomecánica y estructura ósea en ratas diabéticas inducidas con estreptozocina (Kanter *et al.*, Cell Biochem Funct. 2007 Enero 31) y rutina en osteopenia inducida con ovariectomía en ratas (Horcajada-Molteni *et al.*, J Bone Miner Res. 2000 Nov;15(11):2251-8. Comment in: J Bone Miner Res. 2001 May;16(5):970-1). No obstante, incluso si se ha determinado que estos compuestos suceden en plantas de *Solanum glaucophyllum*, la técnica anterior solo trata la vitamina D como principio activo único en el tratamiento de enfermedades tal como se mencionó anteriormente.

15 En el momento del descubrimiento del alto contenido del metabolito de vitamina D 1,25-dihidroxitamina D₃ en *Solanum glaucophyllum*, se ha especulado si la planta se puede utilizar para tratar enfermedades óseas en hombres y animales, y la actividad biológica del extracto se ha explorado en animales de laboratorio. Los experimentos de este tipo utilizaron animales depletados de vitamina D para probar la actividad de la vitamina D (véase, por ejemplo, De Vernejoul *et al.*, (1978), supra). Azcona (Azcona *et al.*, Zootechnica Intern. Febrero 1982 p. 12-13). Morris (Morris KML, The Veterinary Record, 101, 502-504 (1977)) descubrió una mayor resistencia de la cáscara de huevo después de alimentación con hojas secas de *Solanum glaucophyllum*. Norrdin (Norrdin *et al.*, Calcified Tissue International (1979) 28(1):239-243) notó una masa ósea y una resistencia a la rotura mayores en huesos de pollos después de la aplicación de hojas secas de la misma planta. Un extracto de hoja acuoso mostró además una actividad de vitamina D mayor después de incubación con fluidos digestivos de bovinos y ovejas (Mello y Habermehl, Dtsch Tierarztl Wochenschr. 1992 Sep;99(9):371-6). Del documento WO 85/05110 se conoce también que los extractos de las hojas de las plantas sudamericanas de *Solanum glaucophyllum* contienen 1,25-dihidroxitamina D₃ y un principio soluble en agua que es diferente de la 1,25-dihidroxitamina D₃ y que, después de tratamiento con fluidos digestivos, produce 1,25-dihidroxitamina D₃ más un carbohidrato soluble en agua. En dicha técnica anterior, se expone además que el extracto soluble en agua de *Solanum glaucophyllum* tiene una actividad biológica que es similar a la de la 1,25-dihidroxitamina D₃. A partir de la memoria descriptiva de la patente australiana AT 398 372 B que se publicó aproximadamente 9 años después del documento WO 85/05110, se puede ver que las hojas secas de *Solanum glaucophyllum* tienen en efecto la actividad supuesta, pero también el inconveniente conocido mencionado anteriormente de alta toxicidad. Más tarde, Cheng *et al.* (2004) (Cheng *et al.*, Poult Sci. 2004 Mar;83(3):406-13.) descubrieron utilización de fósforo mejorada en pollos de engorde cuando se alimentaron con hojas de *Solanum glaucophyllum*. Además, Foote *et al.* (2004) (Foote *et al.*, J Anim Sci. 2004 Jan;82(1):242-9) descubrieron que la vitamina D y sus metabolitos obtenidos de plantas que contienen metabolitos de este tipo pueden mejorar la ternura de la carne cuando se alimentan antes del sacrificio. Sin embargo, todos estos intentos comparten el inconveniente conocido mencionado anteriormente de alta toxicidad.

40 Además, se dieron hojas secas de las plantas a pacientes que padecían hipertiroidismo e insuficiencia renal hasta durante 7 días. Se observó un efecto normalizador en calcio en plasma (véase, por ejemplo, Mautalen *et al.*, Calcif Tissue Res. 1977 May;22 Suppl:534-7.; y Herrath *et al.*, Vitamin D, Chemical and Clinical Aspects related to Calcium Metabolism. Pp. 703-708. W. de Gruyter, Berlín, Alemania, 1977). En este caso, es particularmente limitativa la aplicación de un extracto de planta no purificado de actividad desconocida, que contiene típicamente alcaloides tóxicos.

45 Adicionalmente, fue común a todos estos ensayos que el material utilizado no se caracterizó y no se midió ningún componente activo en todos los experimentos. Además, no se describieron otros efectos similares a la vitamina D para *Solanum glaucophyllum*.

50 Por otro lado, se han publicado varios documentos académicos sobre intentos para analizar el principio activo de *Solanum glaucophyllum* y para preparar extractos de plantas. Por ejemplo, Peterlik y Wasserman (1975) (véase Peterlik y Wasserman, FEBS Letters (1975) 56:16-19) extrajeron hojas secas con mezclas de cloroformo/metanol, mientras Mello y Habermehl (1998) extrajeron material vegetal seco con agua caliente (véase Mello y Habermehl, Dtsch Tierarztl Wochenschr. 1998 Enero;105(1):25-9). Se realizó una purificación adicional por cromatografía en Sephadex G15 y Sephadex LH20 (véase Vidal *et al.*, Turrialba (1985) 35:65-70) o por cromatografía de HPLC de preparación en columnas con sílice y sílice modificado con C18 como fases estacionarias (Skliar *et al.*, J Steroid Biochem Mol Biol. 1992 Dec;43(7):677-82).

55 La publicación de von Rosenberg S. J., 2006 (Rosenberg S. J., 2006, PhD-thesis, Ludwigs-Maximilians-University, Múnich, Alemania) y la subsecuente publicación de von Rosenberg S. J. *et al.* 2007, (Rosenberg S. J. *et al.*, The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, Volumen 103, Ediciones 3-5, Marzo 2007, Páginas 596-600) describen además extractos de plantas de *Solanum glaucophyllum* y *Trisetum flavescens* para su uso como suplemento alimenticio o para terapia en seres humanos, particularmente en osteoporosis. Los extractos de plantas descritos en este documento fueron proporcionados por Herbonis AG, Basilea, Suiza, y se han preparado por extracción acuosa de plantas secas utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con Sephadex como

material base. El extracto únicamente contuvo el metabolito activo de vitamina D 1,25-dihidroxitamina D₃ como principio activo.

5 Incluso si se han publicado algunos métodos de extracción de laboratorio mientras tanto, ninguna de las publicaciones anteriores describe también un método para extraer y/o purificar un extracto de planta que contiene compuestos de vitamina D con un rendimiento suficientemente alto, es decir, aplicable industrialmente. Los métodos utilizados son prácticos para encontrar el principio activo 1,25-dihidroxitamina D₃, pero no se ha hecho ningún intento para optimizar el rendimiento y minimizar la toxicidad de los subproductos. Se realizaron extracciones con agua pura o composiciones acuosas para separar la 1,25-dihidroxitamina D₃ libre de la forma ligada, o, se utilizó cloroformo, un disolvente tóxico por sí mismo, para aislar la 1,25-dihidroxitamina D₃ libre de los componentes solubles en agua. Para la purificación del principio activo 1,25-dihidroxitamina D, se han descrito varios métodos utilizando cromatografía en columna con material silícico o geles de Sephadex, pero los métodos de este tipo no son factibles para la producción de cantidades mayores de extractos. Particularmente, la cromatografía sobre material silícico ofrece rendimientos bajos de metabolitos de vitamina D y no permite así la producción de extractos de plantas que contienen vitamina D a escala industrial, mostrando una cantidad considerable de vitamina D. Además, ninguna de las aplicaciones anteriores consiguió proporcionar un extracto de planta que superara al menos en parte el inconveniente anterior de alta toxicidad cuando se administra en altas concentraciones.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención superar las desventajas anteriores y proporcionar un extracto de *Solanum glaucophyllum* con una tolerancia mejorada que es obtenible en grandes cantidades de una manera rentable, particularmente un extracto que no muestre las restricciones anteriores debido a la toxicidad de la vitamina D a altas concentraciones.

La presente invención proporciona una solución para el objeto subyacente tal como se muestra a continuación y por las reivindicaciones anejas.

Según la invención, esta necesidad urgente se satisface por un método innovador para producir un extracto de planta enriquecido (y equilibrado) a partir de *Solanum glaucophyllum*, que contiene tanto glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ como flavonoles, particularmente glucósidos de quercetina, en un rendimiento suficientemente alto y por un método, que es aplicable a escala industrial.

Los autores de la presente invención descubrieron sorprendentemente que los extractos de plantas de *Solanum glaucophyllum* muestran un contenido enriquecido tanto de glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ como de flavonoles, particularmente glucósidos de quercetina, que no muestran el inconveniente anterior de alta toxicidad, es decir, metabolitos de vitamina D que se pueden administrar en concentraciones mucho más altas que las mostradas en la técnica sin el riesgo de hipercalcemia. Adicionalmente, los extractos de plantas enriquecidos de este tipo permiten también la administración de concentraciones más bajas tanto de glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ como de flavonoles, particularmente glucósidos de quercetina, que aún provocan un efecto mensurable y bueno. En otras palabras, los autores de la presente invención descubrieron sorprendentemente que un alto contenido tanto en glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ como de flavonoles, particularmente glucósidos de quercetina, en extractos de plantas derivados de *Solanum glaucophyllum*, a diferencia de los extractos conocidos en la técnica que contienen solo un alto contenido de compuestos de vitamina D₃, es capaz de abrir de manera significativa el estrecho margen terapéutico para la medicación utilizando metabolitos de vitamina D. Sin embargo, no existe una divulgación en la técnica que permita la preparación de un extracto de planta enriquecido de este tipo o un extracto de planta que muestre propiedades de este tipo.

Método para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum*:

Un método para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido (y equilibrado) a partir de *Solanum glaucophyllum* que tiene un contenido enriquecido de glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ y flavonoles, específicamente glucósidos de quercetina, se proporciona en este documento, el método preferiblemente comprende las siguientes etapas:

- a) extraer plantas o partes de estas a partir de la especie de *Solanum glaucophyllum* utilizando un disolvente basado en alcohol; y
- b) purificar el extracto obtenido según la etapa a), preferiblemente utilizando las etapas:
 - b1) aplicar el extracto de planta obtenido según la etapa a) a una columna que comprende una resina polimérica no iónica;
 - b2) opcionalmente lavar la columna con agua y/o un disolvente basado en alcohol como se define en este documento;
 - b3) eluir el extracto de planta enriquecido de la columna; y
 - b4) opcionalmente concentrar y/o secar el extracto de planta enriquecido.

Según la etapa de extracción a) del método para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum*, se extraen plantas o partes de estas a partir de la especie *Solanum glaucophyllum* utilizando un disolvente basado en alcohol, que es superior a los métodos de la técnica mencionados anteriormente, que es aplicable a escala industrial. En contraste, los métodos publicados solo se centran en tareas analíticas y no son factibles a escala industrial. Además, los métodos de este tipo solo están diseñados para obtener componentes activos de vitamina D₃ puros. Adicionalmente, los métodos de este tipo no son, en parte, adecuados para uso humano o veterinario debido a la toxicidad de los disolventes utilizados en estos. Como ejemplo, los métodos de extracción para *Solanum glaucophyllum* publicados en la técnica basados en el uso de cloroformo-metanol se describen como los más eficaces, pero no son utilizables para volúmenes mayores e implican reactivos tóxicos. Además, los métodos de extracción publicados que implican solo agua dan como resultado una actividad de vitamina D inferior. Según los propios hallazgos del solicitante, un disolvente basado en alcohol sorprendentemente resultó proporcionar los mejores resultados. Por lo tanto, un disolvente basado en alcohol adecuado para la etapa de extracción a) del método de la invención para preparar y purificar preferiblemente se selecciona de entre el grupo que consiste en una mezcla de agua y un alcohol, o un alcohol solo, donde el alcohol preferiblemente se selecciona de entre metanol, etanol o isopropanol, más preferiblemente de entre etanol o metanol. La extracción de plantas o partes de estas a partir de la especie *Solanum glaucophyllum* según la etapa de extracción a) del método de la invención utilizando otros disolventes adecuados y utilizados ampliamente (por ejemplo, agua) se incluye también en este documento, incluso aunque sea menos favorable para obtener la composición óptima de extracto de planta. Incluso más preferiblemente, el disolvente de la etapa a) del método para preparar y purificar un extracto de planta a partir de *Solanum glaucophyllum* se selecciona de entre una mezcla de etanol/agua que tiene una relación (%) de aproximadamente 100/0 a aproximadamente 0/100 de etanol/agua (v/v), por ejemplo, se puede seleccionar de entre una mezcla de etanol/agua que tiene una relación (%) de aproximadamente 100/0 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 95/5 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 90/10 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 85/15 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 80/20 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 75/25 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 70/30 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 65/35 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 60/40 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 55/45 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 50/50 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 45/55 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 40/60 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 35/65 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 30/70 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 25/75 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 20/80 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 15/85 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 10/90 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 5/95 de etanol/agua (v/v), o aproximadamente 0/100 de etanol/agua (v/v), o se puede seleccionar de una región formada por dos de cualquiera de los valores específicos mencionados anteriormente. Se ha encontrado que las mezclas de este tipo son superiores en la tarea de la invención para obtener el rendimiento máximo de ambos componentes deseables del extracto de planta enriquecido de la invención, es decir, tanto glucósidos de 1,25-dihidroxivitamina D₃ como flavonoles, particularmente glucósidos de quercetina. El disolvente de la etapa de extracción a) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* se selecciona de entre una mezcla de etanol/agua que tiene una relación (%) de aproximadamente 80/20 a aproximadamente 50/50 y/o aproximadamente 35/65 a aproximadamente 20/80 de etanol/agua (v/v).

Descrito de manera alternativa, el disolvente de la etapa de extracción a) del método para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* se puede seleccionar de entre una mezcla de metanol/agua que tiene una relación de metanol/agua como la descrita anteriormente para la mezcla de etanol/agua. Más preferiblemente, la relación de metanol/agua se puede seleccionar de entre una relación (%) de aproximadamente 90/10 a aproximadamente 25/75 de metanol/agua (v/v), por ejemplo, se puede seleccionar de entre una mezcla de metanol/agua que tiene una relación (%) de aproximadamente 90/10 de metanol/agua (v/v), aproximadamente 85/15 de metanol/agua (v/v), aproximadamente 80/20 de metanol/agua (v/v), aproximadamente 75/25 de metanol/agua (v/v), aproximadamente 70/30 de metanol/agua (v/v), aproximadamente 65/35 de metanol/agua (v/v), aproximadamente 60/40 de metanol/agua (v/v), aproximadamente 55/45 de metanol/agua (v/v), aproximadamente 50/50 de metanol/agua (v/v), aproximadamente 45/55 de metanol/agua (v/v), aproximadamente 40/60 de metanol/agua (v/v), aproximadamente 35/65 de metanol/agua (v/v), aproximadamente 30/70 de metanol/agua (v/v), o aproximadamente 25/75 de metanol/agua (v/v), o se puede seleccionar de una región formada por dos de cualquiera de los valores específicos mencionados anteriormente, en particular aproximadamente 90/10 a aproximadamente 60/40 y/o aproximadamente 40/60 a aproximadamente 25/75 de metanol/agua (v/v).

Según otra alternativa descrita, el disolvente de la etapa de extracción a) del método para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* se puede seleccionar de entre una mezcla de isopropanol/agua que tiene una relación isopropanol/agua como la descrita anteriormente para la mezcla de etanol/agua o la mezcla de metanol/agua.

La concentración de las plantas (secas) o partes de estas a partir de la especie *Solanum glaucophyllum* en el disolvente basado en alcohol tal como se definió anteriormente puede requerir una relación específica del disolvente utilizado frente a (la cantidad total de) las plantas (secas) o partes de estas (fármacos) en el disolvente, es decir, la relación disolvente/fármaco (%), que es preferiblemente aproximadamente 4-40 (v/p), más preferiblemente aproximadamente 4-30 (v/p) o aproximadamente 4-15 (v/p), o incluso más preferiblemente puede depender del método de extracción utilizado, por ejemplo, aproximadamente 7-12 u 8-10 (v/p), más preferiblemente aproximadamente 9 (v/p), por ejemplo, para extracciones de tipo percolación, alternativamente aproximadamente 3-

7 o 4-6 (v/p), más preferiblemente aproximadamente 5 (v/p), por ejemplo, para extracciones de tipo maceración. En este contexto, las extracciones de tipo percolación y las extracciones de tipo maceración se contemplan como alternativas equivalentes para la etapa de extracción a) del presente método de la invención.

5 El disolvente según la etapa de extracción a) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* puede contener además aditivos. Los aditivos de este tipo se pueden añadir para mejorar la calidad del extracto obtenido. En general, los aditivos de este tipo pueden estar contenidos en el disolvente según la etapa a) del método de la invención para preparar y purificar en una concentración adecuada para la finalidad pretendida, que se puede determinar por un experto según los requisitos específicos de la etapa de extracción. Típicamente, los aditivos de este tipo se seleccionan de entre una concentración de este tipo, de modo que la extracción según la etapa a) no se altere por estos compuestos, sino que permita la estabilización adicional y/o efecto antioxidante protector, etc. Los aditivos en el contexto de la presente invención pueden incluir, por ejemplo, antioxidantes, tales como, por ejemplo, ácido ascórbico, preferiblemente en una concentración de aproximadamente un 0,01% (p/v) a aproximadamente un 2% (p/v), preferiblemente en una concentración de aproximadamente un 0,05% (p/v) a aproximadamente un 1% (p/v), y de manera más preferida en una concentración de aproximadamente un 0,05% (p/v) a aproximadamente un 0,5% (p/v), o tocoferol o antioxidantes del tipo gallert (E310, E211 o E312), preferiblemente en una concentración de aproximadamente un 0,02 a aproximadamente un 1% (p/v), más preferiblemente en una concentración de aproximadamente un 0,05% (p/v) a aproximadamente un 0,25% (p/v), etc. Los aditivos pueden comprender además ácidos adecuados, preferiblemente, ácidos orgánicos, más preferiblemente ácidos derivados de plantas o ácidos que existen en plantas, incluidos, por ejemplo, ácido acético, ácido sulfúrico, ácido cítrico, etc. preferiblemente en una concentración de aproximadamente un 0,05% (p/v) a aproximadamente un 1% (p/v), incluso más preferiblemente en una concentración de aproximadamente un 0,1% (p/v) a aproximadamente un 0,5% (p/v). Cualquier % (p/v) se determina con respecto al volumen entero del disolvente utilizado en la extracción según la etapa a). La adición de ácidos de este tipo es preferible para reducir reacciones de pardeamiento durante la extracción y las etapas subsecuentes. Por consiguiente, el valor de pH se puede ajustar durante la extracción según la etapa de extracción a) del método de la invención, a un valor de pH específico de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,0, más preferiblemente a un valor de pH específico de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. El ajuste del valor del pH se puede llevar a cabo por adición de una cantidad adecuada de un ácido adecuado, por ejemplo, como se definió anteriormente, o, si es necesario, por una cantidad adecuada de una base adecuada, por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, etc.

La extracción según la etapa a) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* puede comprender la etapa de molido, percolación y/o maceración de las plantas o partes a partir de la especie *Solanum glaucophyllum*, por ejemplo, hojas. El molido, percolación y/o maceración se pueden llevar a cabo tanto en un proceso continuo como en un proceso discontinuo.

35 La etapa de extracción a) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* se puede llevar a cabo en un intervalo de temperatura de una temperatura ambiente a aproximadamente 85°C, por ejemplo, aproximadamente 20 o 30°C a aproximadamente 85°C, más preferiblemente en un intervalo de temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 70°C, y de manera más preferida en un intervalo de temperatura de aproximadamente 40°C a aproximadamente 60°C, particularmente a una temperatura de aproximadamente 40°C, aproximadamente 45°C, aproximadamente 50°C, aproximadamente 55°C, o aproximadamente 60°C, o en un intervalo formado por cualquiera de los valores mencionados anteriormente.

45 La extracción según la etapa a) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* se puede repetir al menos una vez, preferiblemente 1-2 veces, 1-3 veces, 1-5 veces o más, preferiblemente con aproximadamente 1 a aproximadamente 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2 o 1 volumen (es) (de lecho) del mismo disolvente basado en alcohol utilizado para extracción, para aumentar el rendimiento de los componentes activos que se van a extraer. Los disolventes se pueden combinar entonces después de la extracción. Una elección adecuada puede depender del método de extracción utilizado, por ejemplo, una extracción de tipo maceración o percolación. Cuando se utiliza maceración como método de extracción, la etapa de extracción a) preferiblemente se repite 1-2 veces con aproximadamente 2 a aproximadamente 5 volúmenes (de lecho) del mismo disolvente basado en alcohol tal como se utiliza en la primera extracción según la etapa de extracción a). Se observará en este contexto, que, sorprendentemente, los autores de la invención encontraron que no es necesario el molido de las plantas o partes de estas para obtener un buen rendimiento durante la extracción según la etapa a).

55 Alternativamente o adicionalmente, la extracción según la etapa a) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* se puede llevar a cabo en un intervalo de tiempo específico, donde el intervalo de tiempo, es decir, el tiempo de extracción, puede variar de aproximadamente 1 a aproximadamente 48, 24 o aproximadamente 10 horas, preferiblemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 48 horas, más preferiblemente aproximadamente 24 horas.

60 El extracto de planta obtenido según la etapa de extracción a) se puede filtrar. La filtración se puede llevar a cabo utilizando los métodos conocidos en la técnica. La filtración puede suceder, por ejemplo, por bombeo del disolvente

a través de una abertura de malla de 40 a 60 μm , preferiblemente 50 μm . El extracto obtenido según la etapa de extracción a) se puede filtrar de manera continua, después de cada etapa de extracción o al final de todas las etapas de extracción según la etapa de extracción a).

5 El extracto obtenido según la etapa de extracción a) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta a partir de *Solanum glaucophyllum* se puede concentrar (antes, o subsecuente a la filtración) y/o secar utilizando un método adecuado. En general, se pretende que la concentración y/o secado en el contexto de la etapa de extracción a) al igual que en la presente invención signifique cualquier reducción de humedad o líquido del extracto de planta, por ejemplo, después de percolación o maceración de las plantas o partes de estas a partir de la especie *Solanum glaucophyllum* según la etapa a). Una reducción de este tipo de la humedad o líquido del extracto de la planta, obtenido, por ejemplo, durante la etapa de extracción a), se puede llevar a cabo al concentrar el extracto, preferiblemente utilizando medios y métodos de concentración y/o secado tradicionales, más preferiblemente utilizando métodos que permiten reducir cuidadosamente la humedad o líquido del extracto de planta enriquecido sin descomponer sus constituyentes principales, particularmente los glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ y flavonoles, particularmente los glucósidos de quercetina. Los métodos para la concentración (y/o secado) pueden incluir, sin limitarse a lo siguiente, por ejemplo, evaporación, por ejemplo, evaporación al vacío, o destilación de los disolventes utilizando temperaturas estables. Los métodos de secado pueden utilizar un extracto ya concentrado, pero también pueden comenzar directamente a partir de un extracto de planta obtenido después de la extracción (y/o purificación). Los métodos de secado de este tipo pueden incluir, sin limitarse a lo siguiente, por ejemplo, secado por atomización, secado por banda, liofilización, etc., particularmente, cuando el extracto de planta (intermediario) se va a secar hasta un contenido de o cerca de un 100% de materia no volátil.

Preferiblemente, durante la concentración o secado del extracto de planta según la etapa de extracción a), los disolventes orgánicos se retiran primero, entonces se retira el agua hasta que se obtiene una disolución que contiene un contenido específico (%) de agua y un contenido específico (%) de materia no volátil. Como ejemplo, el extracto de planta obtenido según la etapa de extracción a) se puede concentrar o secar hasta que el extracto de planta contenga un contenido de aproximadamente un 90-80% de agua y aproximadamente un 10-20% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 85-75% de agua y aproximadamente un 15-25% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 80-70% de agua y aproximadamente un 20-30% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 75-65% de agua y aproximadamente un 25-35% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 70-60% de agua y aproximadamente un 30-40% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 65-55% de agua y aproximadamente un 35-45% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 60-50% de agua y aproximadamente un 40-50% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 55-45% de agua y aproximadamente un 45-55% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 50-40% de agua y aproximadamente un 50-60% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 45-35% de agua y aproximadamente un 55-65% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 40-30% de agua y aproximadamente un 60-70% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 35-25% de agua y aproximadamente un 65-75% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 30-20% de agua y aproximadamente un 70-80% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 25-10% de agua y aproximadamente un 75-85% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 20-15% de agua y aproximadamente un 80-90% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 15-5% de agua y aproximadamente un 85-95% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 10-0% de agua y aproximadamente un 90-100% de materia no volátil, preferiblemente un contenido de aproximadamente un 85-75% de agua y aproximadamente un 15-25% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 80-70% de agua y aproximadamente un 20-30% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 75-65% de agua y aproximadamente un 25-35% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 70-60% de agua y aproximadamente un 30-40% de materia no volátil, un contenido de aproximadamente un 65-55% de agua y aproximadamente un 35-45% de materia no volátil, y de manera más preferida un contenido de aproximadamente un 75-65% de agua y aproximadamente un 25-35% de materia no volátil, cada uno determinada en base al peso total del extracto de planta antes de la concentración o secado, por ejemplo, tal como se obtiene directamente después de extracción de tipo percolación o maceración. Una concentración y/o secado de este tipo hasta un contenido específico de materia no volátil permite igualar las diferentes concentraciones de principios activos a una concentración específica del extracto de planta obtenido según la etapa de extracción a), que se puede obtener utilizando diferentes volúmenes del (de los) disolvente(s) (alternativo/s) anterior(es) para extracción, por ejemplo, cuando se repite la extracción según la etapa a). La concentración y/o secado del extracto de planta obtenido según la etapa a) hasta un contenido de aproximadamente un 100% de materia no volátil permite adicionalmente almacenar el extracto hasta su uso para una etapa del proceso posterior con un mínimo de espacio requerido.

Finalmente, el extracto de planta obtenido según la etapa a) se puede someter a un tratamiento con calor/temperatura alta para aumentar la vida útil en depósito del extracto, preferiblemente para permitir un almacenamiento (mayor) del extracto. Una etapa de este tipo puede suceder antes o subsecuente a la concentración y/o secado del extracto de planta obtenido según la etapa a). El tratamiento con calor/temperatura alta se puede llevar a cabo utilizando los métodos conocidos en la técnica. Más preferiblemente, el tratamiento con calor/temperatura alta se lleva a cabo en condiciones suaves, preferiblemente entre aproximadamente 100°C a aproximadamente 145°C, por ejemplo, a un mínimo de aproximadamente 100°C, preferiblemente durante

aproximadamente de 30 a 40 segundos, o a un máximo de aproximadamente 145°C, preferiblemente durante aproximadamente de 2 a 10 segundos, o a cualquier valor intermedio, por ejemplo, aproximadamente 105°C, 110°C, 115°C, 120°C, 125°C, 130°C, 135°C, o aproximadamente 140°C.

5 Según una realización particularmente preferida, la etapa de extracción a) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* se puede llevar a cabo a escala de laboratorio o a escala industrial, donde las condiciones de laboratorio tal como se definen en este documento se puede transferir también a escala industrial.

10 Si se lleva a cabo a escala de laboratorio, la etapa de extracción a) del método de la invención para preparar y purificar comienza típicamente, sin limitarse a lo siguiente, con una cantidad de plantas o partes a partir de la especie *Solanum glaucophyllum* en un intervalo de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 1000 g, más preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 1 g a aproximadamente 100 g, y de manera más preferida de aproximadamente 1 g a aproximadamente 10 g, donde las hojas se pueden moler, percolar o macerar en el disolvente basado en alcohol. El disolvente basado en alcohol es tal como se definió anteriormente.

15 Además, el valor de pH y las temperaturas utilizados durante el proceso de extracción a escala de laboratorio se pueden seleccionar tal como se definió anteriormente en general, donde preferiblemente se seleccionan las condiciones de este tipo, lo que lleva a una eficacia de la extracción mayor que 3 (véase a continuación en la Tabla 1, Ejemplo 1A). Preferiblemente, se pueden utilizar temperaturas de aproximadamente 40°C a 60°C, más preferiblemente una temperatura de aproximadamente 50°C. La extracción se puede repetir tal como se mencionó anteriormente, preferiblemente 1-5 veces.

20 En este contexto, la eficacia de la extracción según la etapa a) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* se puede calcular según la siguiente fórmula:

$$yf = \text{VDM}_{(\text{extracto})} * [\text{Qu}_{(\text{extracto})}/1000] * ef$$

VDM = 1,25-dihidroxivitamina D₃ (o un glucósido de esta o un compuesto de vitamina D activo adicional tal como se definió anteriormente)

25 Qu = quercetina

ef: factor de proceso empírico

yf: bondad ponderada del proceso

30 donde los términos [VDM] y [Qu] se calculan por g de extracto. El factor [ef] pondera factores empíricos tales como costes, ecología y calidad del extracto (por ejemplo, solubilidad). Como resultado sorprendente de la presente invención, la eficacia de la extracción yf mayor que 3 es satisfactoria y superior a métodos de extracción conocidos y cumple los criterios de la presente invención. En consecuencia, una realización preferida de la etapa de extracción a) del método de la presente invención proporciona extractos que tienen un valor de yf que es > 2, más preferiblemente > 2,5, incluso más preferiblemente > 3.

35 Si se lleva a cabo a escala industrial, la etapa de extracción a) del método de la invención para preparar y purificar comienza típicamente, sin limitarse a lo siguiente, con una cantidad de plantas o partes a partir de la especie *Solanum glaucophyllum* en el intervalo de al menos aproximadamente 1000 g, preferiblemente al menos aproximadamente 10 o aproximadamente 100 kg, más preferiblemente al menos aproximadamente 250 kg, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 500 kg, al menos aproximadamente 1000 kg o incluso al menos aproximadamente 2500 kg, al menos aproximadamente 3000, al menos aproximadamente 4000 kg, al menos aproximadamente 5000 kg o más. La cantidad de plantas o partes a partir de la especie *Solanum glaucophyllum* se puede seleccionar por un experto en base a los requisitos específicos, por ejemplo, la planta industrial utilizada, la cantidad que se va a procesar realmente, etc. Las plantas o partes a partir de la especie *Solanum glaucophyllum* tales como las hojas se pueden moler, percolar y/o macerar en el disolvente basado en alcohol definido anteriormente. Se pueden utilizar molido, percolación y/o maceración en la etapa de extracción a).

45 Por ejemplo, se puede llevar a cabo percolación por medio de cualquier método conocido en la técnica, preferiblemente por rellenado de al menos un recipiente, (donde, dependiendo del tipo de planta industrial, sin limitarse a lo siguiente, al menos uno o 2, 3, 4, 5 o incluso más recipientes (rellenados cíclicamente) se pueden utilizar) con las plantas de partes de estas a partir de *Solanum glaucophyllum*, por ejemplo, hojas, añadiendo disolvente tal como se definió anteriormente a la mezcla. El disolvente basado en alcohol se puede seleccionar tal como se definió anteriormente para la etapa de extracción a) en general. Preferiblemente, los disolventes para percolación pueden comprender adicionalmente aditivos tal como se definió anteriormente para la etapa de extracción a) en general. Además, el valor de pH y las temperaturas utilizados durante el proceso de extracción a escala industrial se pueden seleccionar tal como se definió anteriormente en general, donde preferiblemente se seleccionan las condiciones de este tipo, lo que lleva a una eficacia de la extracción mayor que 3 (correspondiente a la Tabla 1, Ejemplo 1A). Preferiblemente, se puede utilizar un valor de pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,0, más preferiblemente un valor de pH específico de aproximadamente 5,5 a aproximadamente

- 6,5. Preferiblemente, la mezcla se calienta a las temperaturas anteriores, preferiblemente entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 75°C, más preferiblemente entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 60°C. El proceso de percolación se puede llevar a cabo como un proceso continuo, proceso semicontinuo, o cualquier otro proceso, que permita bombear/mover el disolvente basado en alcohol anterior con un caudal específico a al menos un recipiente. Preferiblemente, un caudal de este tipo es aproximadamente 500 a 1500 litros por hora, más preferiblemente aproximadamente 800 a 1200 litros por hora, y de manera más preferida aproximadamente 1000 litros por hora. El tiempo de extracción puede variar tal como se definió anteriormente, por ejemplo, de aproximadamente 6 a aproximadamente 48 horas y preferiblemente es aproximadamente 24 horas. El extracto obtenido por percolación se puede filtrar, concentrar y/o secar tal como se describió anteriormente.
- 5
- 10 Según una realización particularmente preferida, la extracción según la etapa a) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum*, si se lleva a cabo a escala industrial, es una extracción de tipo percolación y comprende las siguientes subetapas específicas (proceso de extracción EP):
- 15 EP1) rellenar al menos un recipiente (rellenado cíclicamente) con las plantas o partes de esta a partir de la especie *Solanum glaucophyllum*, por ejemplo, en las cantidades definidas anteriormente;
- EP2) añadir un disolvente basado en alcohol, donde el disolvente basado en alcohol preferiblemente se selecciona de entre una mezcla de etanol/agua tal como se definió anteriormente, por ejemplo, en una relación (%) de aproximadamente 25/75, o alternativamente de aproximadamente 75/25 de etanol/agua (v/v), donde la relación disolvente/fármaco preferiblemente es tal como se definió anteriormente, por ejemplo, aproximadamente 7-12 (v/p), de manera más preferida aproximadamente 9 (v/p);
- 20 EP3) opcionalmente ajustar el pH a aproximadamente 5,5-6,5 tal como se definió anteriormente;
- EP4) extraer las plantas y partes a partir de la especie *Solanum glaucophyllum* en el disolvente basado en alcohol, preferiblemente con un caudal de 800-1200 litros por hora, más preferiblemente de 1000 litros/hora, preferiblemente durante 6-48 horas, más preferiblemente durante 24 horas;
- 25 EP5) calentar la mezcla durante la extracción a una temperatura tal como se definió anteriormente, preferiblemente aproximadamente 40-75°C, más preferiblemente aproximadamente 40-60°C;
- EP6) opcionalmente concentrar el extracto de planta de las etapas EP4 y EP5 al vacío tal como se definió anteriormente, por ejemplo, por evaporación de los disolventes orgánicos primero y luego el agua hasta que se obtenga una disolución que contiene aproximadamente un 75-65% de agua y aproximadamente un 25-35% de materia no volátil; y
- 30 EP7) opcionalmente secar por atomización, secar por banda, o liofilizar el extracto de planta (concentrado).
- Alternativamente, se puede llevar a cabo una maceración tal como se definió anteriormente, utilizando típicamente un recipiente del reactor que comprende un mezclador o una unidad de mezclado y preferiblemente un sistema de calefacción. Además, la maceración se puede llevar a cabo al rellenar el recipiente con las hojas, añadiendo el disolvente basado en alcohol tal como se definió anteriormente y calentando y mezclando la mezcla (en el recipiente), preferiblemente dentro de los límites de tiempo de extracción anteriores y las temperaturas y valores de pH anteriores. Preferiblemente, el disolvente basado en alcohol para maceración puede comprender adicionalmente al menos un aditivo tal como se definió anteriormente para la etapa de extracción a) en general. El disolvente basado en alcohol se puede seleccionar además en una relación (%) de etanol/agua (v/v) tal como se definió anteriormente para la etapa de extracción a) en general. Además, el valor de pH y las temperaturas utilizados durante el proceso de extracción a escala industrial se pueden seleccionar tal como se definió anteriormente en general, donde preferiblemente se seleccionan las condiciones de este tipo, lo que lleva a una eficacia de la extracción mayor a 3 (correspondiente a la Tabla 1, Ejemplo 1A). Preferiblemente, se puede utilizar un valor de pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,0, más preferiblemente un valor de pH específico de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Preferiblemente, la temperatura es aproximadamente 55°C durante 24 horas. El extracto obtenido por maceración se puede filtrar, lavar, concentrar y/o secar tal como se describió anteriormente.
- 35
- 40
- 45
- Según una realización particularmente preferida, la extracción según la etapa a) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum*, si se lleva a cabo a escala industrial, es una extracción de tipo maceración y comprende las siguientes subetapas específicas (proceso de extracción EM):
- 50 EM1) rellenar al menos un recipiente con las plantas o partes de estas a partir de la especie *Solanum glaucophyllum*, preferiblemente, equipado con un mezclador y preferiblemente con un calentador;
- EM2) añadir un disolvente basado en alcohol, donde el disolvente basado en alcohol preferiblemente se selecciona de entre una mezcla de etanol/agua tal como se definió anteriormente, por ejemplo, en una relación (%) de aproximadamente 65/35 de etanol/agua (v/v), donde la relación disolvente/fármaco preferiblemente es tal como se
- 55

definió anteriormente, por ejemplo, aproximadamente 4-6 (v/p), de manera más preferida aproximadamente 5 (v/p); el disolvente basado en alcohol preferiblemente contiene adicionalmente un aditivo tal como se definió anteriormente, por ejemplo, 0,1% de ácido ascórbico;

5 EM3) opcionalmente ajustar el pH a aproximadamente 5,5-6,5 tal como se definió anteriormente, preferiblemente aproximadamente 5,5;

EM4) extraer las plantas y partes de estas a partir de la especie *Solanum glaucophyllum* en el disolvente basado en alcohol a una temperatura y un tiempo tal como se definió anteriormente, preferiblemente aproximadamente 55°C durante aproximadamente 24 horas;

10 EM4) quitar el extracto de planta del recipiente y filtrar este, por ejemplo, al bombearlo a través de una abertura de malla de 50 µm;

EM5) opcionalmente lavar el sólido remanente de la extracción de las etapas EM4 y EM5 una o dos veces con la misma mezcla de etanol/agua tal como se definió anteriormente, preferiblemente en una relación de disolvente/fármaco de aproximadamente 3;

15 EM6) opcionalmente concentrar el extracto de planta al vacío por evaporación de los disolventes orgánicos primero y luego el agua hasta que se obtenga una disolución que contiene un 75-65% de agua y un 25-35% de materia no volátil; y

EM7) opcionalmente secar por atomización, secar por banda, o liofilizar el extracto de planta (concentrado).

El método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta a partir de *Solanum glaucophyllum* comprende además una etapa de purificación b) para purificar el extracto obtenido según la etapa de extracción a).
 20 Una etapa de purificación b) de este tipo es crucial para el método de la invención para obtener los principios principales del extracto de planta de la invención con buenos rendimientos, es decir, tanto los glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ como los flavonoles, particularmente glucósidos de quercetina. El resultado más sorprendente fue que un buen rendimiento en la etapa de purificación b) depende principalmente de aplicar el extracto a una
 25 columna que comprende una resina polimérica no iónica, lo que no se esperaría por un experto basado en la técnica anterior. Solo el uso de una resina polimérica no iónica de este tipo permite un enriquecimiento eficaz de los dos principios principales del extracto de planta enriquecido de la invención a partir de *Solanum glaucophyllum* y lleva a un rendimiento significativamente más alto de estos principios activos, es decir, tanto de los glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ como de los flavonoles, particularmente de glucósidos de quercetina. Un enriquecimiento de este tipo para ambos principios activos no es posible sin otros materiales de columna. Los métodos conocidos en la
 30 técnica para el aislamiento de componentes vegetales en tamaño técnico, tal como se indica en la parte introductoria de la descripción, comprenden destilación, extracciones disolvente-disolvente (contraflujo) en una primera elección seguido de métodos cromatográficos tales como cromatografía en columna. Los procesos cromatográficos de este tipo se pueden omitir típicamente solo en unos pocos casos, por ejemplo, cuando el producto de interés posee propiedades fisicoquímicas que permiten obtener un producto suficientemente purificado utilizando solo extracción
 35 líquido-líquido o destilación. Sin embargo, en la técnica, todos los intentos conocidos de purificación tuvieron el objetivo de obtener un producto de vitamina D activo puro pero no una combinación de los dos principios activos anteriores. Dada la necesidad de cromatografía para purificación adicional, los expertos en la técnica siempre han elegido material silíceo y Sephadex como materiales para purificación cromatográfica de extractos de plantas tal como se puede encontrar en la bibliografía (véase lo anterior). Ambos métodos, es decir, material silíceo y
 40 Sephadex, tal como han encontrado los autores de la presente invención, tienen inconvenientes significativos en copurificación de ambos principios activos: la cromatografía en el material silíceo ofrece rendimientos inferiores de 1,25-dihidroxitamina D₃, mientras que la cromatografía con Sephadex únicamente enriquece la 1,25-dihidroxitamina D₃ pero discrimina los flavonoles tal como se demuestra en la línea 9 de la Figura 6. Por lo tanto, los materiales de este tipo no son adecuados para la copurificación de los dos principios activos que tienen
 45 propiedades fisicoquímicas ligeramente diferentes. A este respecto, los flavonoles son un componente, que aparentemente ni se ha contemplado como importante para el tratamiento ni se ha hecho ningún intento para purificar extractos de plantas que contienen ambos principios activos. Por consiguiente, un experto en el campo siempre habría elegido un método para purificar un extracto de planta que comprende un metabolito de vitamina D como componente principal en la base de material silíceo o Sephadex tal como se mencionó anteriormente. Los
 50 autores de la presente invención han encontrado también que resinas poliméricas iónicas (véase de Boland *et al.*, supra) no son una alternativa adecuada, porque se encontró que el contenido de sal del extracto de planta excede la capacidad de la columna, lo que requiere sales iónicas para elución.

En contraste con lo que esperaría un experto de la técnica anterior, los autores de la presente invención encontraron sorprendentemente que las resinas poliméricas no iónicas son adecuadas generalmente para el objeto dado,
 55 específicamente un método que proporciona una combinación de los dos principios activos, es decir, tanto glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ como flavonoles, particularmente glucósidos de quercetina, y en los cuales el contenido de estos principios activos es casi óptimo y el contenido alcaloide es casi mínimo.

Por consiguiente, la etapa de purificación b) para purificar el extracto obtenido según la etapa a) preferiblemente comprende las siguientes etapas:

b1) aplicar el extracto de planta obtenido según la etapa a) a una columna que comprende una resina polimérica no iónica;

5 b2) opcionalmente lavar la columna con agua y/o un disolvente basado en alcohol como se define anteriormente;

b3) eluir el extracto de planta enriquecido de la columna; y

b4) opcionalmente secar el extracto de planta enriquecido.

Según la subetapa b1) de la etapa de purificación b) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum*, el extracto se aplica a una columna que comprende una resina polimérica no iónica. En el contexto de la presente invención, las resinas poliméricas no iónicas adecuadas para la subetapa b1) de la etapa b) pueden comprender resinas poliméricas no iónicas (porosas o no porosas), incluidos, pero no se limitan a lo siguiente, poliestireno, copolímeros de etireno-divinilbenceno, polímeros de éster acrílico y resinas polifenólicas. Más preferiblemente, los materiales no iónicos (porosos o no porosos) se seleccionan de entre Amberlite XAD-1, XAD-2, XAD-4, XAD-5 (que son marcas registradas, y fabricadas por Rohm and Haas Co., EE. UU, donde estas resinas están compuestas por copolímero de etireno-divinilbenceno) y Diaion HP10, HP20, HP30, HP40, HP50 (que son marcas registradas, y fabricadas por Mitsubishi Chemical Co., Japón, donde estas resinas están compuestas por copolímero de etireno-divinilbenceno), Amberlite XAD-7, XAD-7 HP, XAD-8 o XAD-1180 (marcas registradas para absorbentes compuestos de polímero de éster acrílico, fabricados por Rohm and Haas Co.), y Duolite S-30 (marca registrada para un absorbente compuesto de resina fenólica, fabricado por Chemical Process Co., EE. UU.), o resinas poliméricas no iónicas que son equivalentes a las resinas mencionadas específicamente antes, por ejemplo, cualquier resina equivalente de cualquier otro proveedor, incluso más preferiblemente los materiales no iónicos (porosos o no porosos) adecuados para la etapa b) del método de la invención se seleccionan de entre las resinas Amberlite XAD incluidas Amberlite XAD-1, XAD-2, XAD-4, XAD-5, y Amberlite XAD-7, XAD-7 HP, XAD-8 o XAD-1180, y de manera más preferida de entre las resinas Amberlite XAD-7, XAD-7 HP, XAD-8 o XAD-1180, o las resinas poliméricas no iónicas de este tipo que son equivalentes a las resinas mencionadas especialmente anteriormente, por ejemplo, cualquier resina equivalente de cualquier otro proveedor.

Además, los materiales no iónicos adecuados para la subetapa b1) de la etapa de purificación b) preferiblemente no comprenderán resinas basadas en dextrano, más preferiblemente ningún material de resina Sephadex o Superdex, e incluso más preferiblemente ningún material de resina Sephadex o Superdex no iónico, los cuales preferiblemente se descartan de la materia de la presente invención de materiales no iónicos adecuados para la etapa b).

Se puede llevar a cabo la aplicación del extracto de planta a una columna en la subetapa b1) de la etapa de purificación b) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* utilizando cualquier método adecuado de la técnica. Sin limitarse a lo siguiente, los métodos de este tipo pueden comprender el uso de jeringuillas, etc., si el método de la invención se lleva a cabo a escala de laboratorio, o de bombas, si el método de la invención se lleva a cabo a escala industrial, etc. Preferiblemente, se utilizan columnas para aplicar el extracto de planta que tienen una relación longitud/amplitud de aproximadamente 2 a 6. Las columnas se pueden prelavar antes del uso con un disolvente tal como se define en este documento, preferiblemente con un disolvente basado en alcohol tal como se definió anteriormente, y/o con agua y/o acetona. La columna se puede equilibrar además antes del uso, preferiblemente utilizando agua o un disolvente basado en alcohol tal como se definió anteriormente, donde la columna preferiblemente no se seca durante el equilibrado. Cuando se aplica el extracto de planta a la columna según la subetapa b1) de la etapa de purificación b), el extracto de planta (como una disolución acuosa debido al contenido de una disolución tal como se definió anteriormente) se puede aplicar o bombear a la parte superior de la columna, preferiblemente con una velocidad de 1, 2, 3, 4, 5 o más volúmenes de lecho, preferiblemente a 3 volúmenes de lecho. El mismo extracto de planta obtenido según la etapa de extracción a) se puede aplicar varias veces a la columna, por ejemplo, una vez, dos veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o incluso más, donde el primer eluyente (típicamente claro) de la columna se puede descartar.

Según una subetapa b2) opcional de la etapa de purificación b) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum*, la columna con el extracto de planta aplicado se lava opcionalmente con agua y/o un disolvente basado en alcohol tal como se definió anteriormente. Si se utiliza un disolvente basado en alcohol, el disolvente basado en alcohol de este tipo puede ser cualquier disolvente basado en alcohol mencionado anteriormente, preferiblemente un disolvente basado en alcohol de este tipo que no contiene típicamente una cantidad de alcohol superior a un 20% (v/v) para minimizar o prevenir una elución temprana del extracto de planta enriquecido o de cualquiera de sus componentes de la columna. Particularmente, los disolventes basados en alcohol adecuados se pueden seleccionar, sin limitarse a lo siguiente, de entre una mezcla de etanol/agua que tiene una relación (%) de aproximadamente 0/100 a aproximadamente 20/80 de etanol/agua (v/v), por ejemplo, se puede seleccionar de entre una mezcla de etanol/agua que tiene una relación (%) de aproximadamente 0/100 de etanol/agua (v/v) a aproximadamente 5/95 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 10/90 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 15/85 de etanol/agua (v/v), o aproximadamente 20/80 de etanol/agua (v/v),

más preferiblemente una mezcla de etanol/agua que tiene una relación (%) de aproximadamente 5/95 de etanol/agua

(v/v), aproximadamente 10/90 de etanol/agua (v/v), o de aproximadamente 15/85 de etanol/agua (v/v). Alternativamente, pero no de manera menos preferida, el disolvente basado en alcohol de la subetapa b2) de la etapa de purificación b) del método de la invención se puede seleccionar de entre una mezcla de metanol/agua que tiene un contenido de metanol/agua tal como se describió anteriormente para la mezcla de etanol/agua. La etapa de lavado opcional según la subetapa b2) de la etapa de purificación b) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* se puede llevar a cabo al menos una vez, preferiblemente 1-2 veces, opcionalmente 1-3 veces, 1-4 veces, 1-5 veces o más. El lavado según la subetapa b2) de la etapa b) del método de la invención puede seguir una secuencia específica de agua y/o disolventes basados en alcohol. Por ejemplo, la columna se puede lavar en una primera etapa al menos una vez con agua o cualquiera de los disolventes basados en alcohol mencionados anteriormente, preferiblemente agua, por ejemplo, una vez, dos veces, 3 veces, etc., por ejemplo, una vez con agua. Un primer lavado con agua u otro disolvente preferiblemente se lleva a cabo hasta que el eluyente se decolore. Entonces, en una segunda etapa de lavado opcional, puede seguir un procedimiento de lavado adicional, utilizando un disolvente diferente, es decir, agua o disolventes basados en alcohol tal como se definió anteriormente, preferiblemente un disolvente basado en alcohol que tiene una concentración tal como se mencionó específicamente antes. La columna preferiblemente se puede lavar en una segunda etapa de lavado al menos una vez, dos veces, 1-3 veces, 1-4 veces, 1-5 veces o incluso más, preferiblemente 1-3 veces con un disolvente basado en alcohol tal como se definió anteriormente. El disolvente basado en alcohol preferiblemente es tal como se definió anteriormente. Un segundo lavado opcional de este tipo preferiblemente se lleva a cabo utilizando 1, 2, 3, 4, 5, (1-2, 1-3, 1-4, 1-5) o más volúmenes de lecho (de la columna), preferiblemente 1 a 3 volúmenes de lecho (de la columna).

Según la subetapa b3) de la etapa de purificación b) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum*, el extracto de planta enriquecido se eluye de la columna. Para la elución de la columna, un disolvente tal como se describió anteriormente se puede seleccionar, incluido un alcohol, tal como etanol, metanol, isopropanol, preferiblemente etanol o metanol, o una cetona, tal como acetona, o un disolvente basado en alcohol tal como se definió anteriormente. Un disolvente basado en alcohol adecuado puede comprender cualquier disolvente basado en alcohol, por ejemplo, una mezcla de etanol/agua, sin limitarse a lo siguiente, que tiene una relación (%) de aproximadamente 100/00 a aproximadamente 70/30 de etanol/agua (v/v), por ejemplo, que tiene una relación (%) de aproximadamente 100/00 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 95/5 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 90/10 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 85/15 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 80/20 de etanol/agua (v/v), aproximadamente 75/25 de etanol/agua (v/v), o aproximadamente 70/30 de etanol/agua (v/v). Más preferiblemente, la mezcla de etanol/agua se puede seleccionar de entre una mezcla de etanol/agua que tiene una relación (%) de aproximadamente 100/00 de etanol/agua (v/v) a aproximadamente 95/5 de etanol/agua (v/v), más preferiblemente de aproximadamente 95/5, 96/4, 97/3, 98,2, 99/1 o 100/0 de etanol/agua (v/v). Alternativamente, pero no de manera menos preferida, el disolvente basado en alcohol de la subetapa b3) de la etapa de purificación b) del método de la invención se puede seleccionar de entre una mezcla de metanol/agua que tiene un contenido de metanol/agua tal como se describió anteriormente para la mezcla de etanol/agua o de entre una mezcla de isopropanol/agua que tiene un contenido de isopropanol/agua tal como se describió anteriormente para la mezcla de etanol/agua. Para la elución del extracto de planta enriquecido de la columna según la subetapa b3) de la etapa de purificación b), el disolvente se aplica a la columna utilizando 1, 2, 3, 4, 5, (1-2, 1-3, 1-4, 1-5) o más volúmenes de lecho (de la columna), preferiblemente 2 a 5 volúmenes de lecho (de la columna).

Según una subetapa b4) opcional de la etapa de purificación b) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum*, el extracto de planta enriquecido se puede secar opcionalmente tal como ya se describió anteriormente para la etapa de extracción a). Preferiblemente, el extracto de planta se puede secar sin limitarse a lo siguiente, por ejemplo, por secado por atomización, secado por banda, liofilización, etc., preferiblemente hasta un contenido de aproximadamente o casi un 100% de materia no volátil, por ejemplo, un contenido de aproximadamente un 10-0% de agua y aproximadamente un 90-100% de materia no volátil, cada valor determinado en base al peso total del extracto de planta antes del secado, por ejemplo, tal como se obtiene según la subetapa b3) de la etapa de purificación b) subsecuente a la elución.

El secado del extracto de planta según la subetapa b4) opcional de la etapa de purificación b) del método de la invención para preparación y purificación, tal como se definió anteriormente, se puede combinar además con o seguir por un tratamiento con calor/temperatura alta tal como se definió anteriormente para la etapa de extracción a) para aumentar la vida útil en depósito del extracto de planta enriquecido, preferiblemente para permitir el almacenamiento del extracto de planta enriquecido, por ejemplo, si el extracto se va a almacenar antes de su uso.

Según una realización particularmente preferida, la purificación según la etapa b) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum*, preferiblemente si se lleva a cabo a escala de laboratorio, comprende las siguientes características específicas (proceso de purificación PL):

PL1) aplicar el extracto de planta obtenido según la etapa a) a una columna que comprende una resina polimérica no iónica, preferiblemente seleccionada de entre Amberlite XAD-7 HP o XAD-1180 o cualquier resina equivalente de cualquier otro proveedor.

5 PL2) lavar la columna una vez, preferiblemente al menos dos veces, opcionalmente 3 veces, con agua, preferiblemente hasta que el efluente se decolore, y lavar la columna al menos una vez con una mezcla de etanol/agua que preferiblemente tiene una relación (%) tal como se definió anteriormente, por ejemplo, entre aproximadamente 0/100 de etanol/agua (v/v) y aproximadamente 10/90 de etanol/agua (v/v), más preferiblemente aproximadamente 5/95 de etanol/agua (v/v), preferiblemente con 1-3 volúmenes de lecho; y

10 PL3) eluir el extracto de planta enriquecido de la columna utilizando un disolvente basado en alcohol tal como se definió anteriormente, preferiblemente una mezcla de etanol/agua, más preferiblemente que tiene una relación (%) tal como se definió anteriormente, por ejemplo, entre aproximadamente 95/5 de etanol/agua (v/v) y aproximadamente 100/0 de etanol/agua (v/v), más preferiblemente aproximadamente 96/4 de etanol/agua (v/v), preferiblemente con 2-5 volúmenes de lecho.

PL4) opcionalmente secar el extracto de planta enriquecido obtenido según la etapa PL3).

15 Según una realización particularmente preferida, la purificación según la etapa b) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum*, preferiblemente si se lleva a cabo a escala industrial, comprende las siguientes características específicas (proceso de purificación PF):

20 PF1) aplicar el extracto de planta obtenido según la etapa a), preferiblemente utilizando un proceso (de tipo de extracción de) percolación (etapas de proceso EP1 a EP7), más preferiblemente con una mezcla de etanol/agua que tiene una relación (%) de aproximadamente 25/75 de etanol/agua (v/v), a una columna que comprende una resina polimérica no iónica, preferiblemente seleccionada de entre Amberlite XAD-7 HP o XAD-1180 o cualquier resina equivalente de cualquier otro proveedor, y reaplicar el efluente de la columna de nuevo a la columna, preferiblemente tres veces;

25 PF2) lavar la columna al menos una vez con agua, preferiblemente hasta que el efluente se decolore, y lavar la columna al menos una vez con una mezcla de etanol/agua que tiene una relación (%) de aproximadamente 10/90 de etanol/agua (v/v) a aproximadamente 0/100 de etanol/agua (v/v), preferiblemente con 2 volúmenes de lecho; y

30 PF3) eluir el extracto de planta enriquecido de la columna utilizando una mezcla de etanol/agua que tiene una relación (%) de aproximadamente 95/5 de etanol/agua (v/v) a aproximadamente 100/0 de etanol/agua (v/v), preferiblemente de aproximadamente 96/4, 97/3, 98/2, 98,2, 99/1 o 100/0 de etanol/agua (v/v), de manera más preferida de aproximadamente 96/4 de etanol/agua (v/v).

PF4) opcionalmente secar el extracto de planta enriquecido obtenido según la etapa PF3).

Según otra realización particularmente preferida, la purificación según la etapa b) del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum*, preferiblemente si se lleva a cabo a escala industrial, comprende las siguientes características específicas (proceso de purificación ES):

35 PS1) aplicar el extracto de planta obtenido según la etapa a), preferiblemente utilizando un proceso (de tipo de extracción de) maceración (etapas de proceso EM1 a EM7), más preferiblemente con una mezcla de etanol/agua que tiene una relación (%) de aproximadamente 65/35 de etanol/agua (v/v), a una columna que comprende una resina polimérica no iónica, preferiblemente seleccionada de entre Amberlite XAD-7 HP o XAD-1180 o cualquier resina equivalente de cualquier otro proveedor, y reaplicar el efluente de la columna de nuevo a la columna, preferiblemente tres veces;

40 PS2) lavar la columna al menos una vez con agua, preferiblemente hasta que el efluente se decolore, y lavar la columna al menos una vez con una mezcla de etanol/agua que tiene una relación (%) de aproximadamente 10/90 de etanol/agua (v/v) a aproximadamente 0/100 de etanol/agua (v/v), preferiblemente con 2 volúmenes de lecho; y

45 PS3) eluir el extracto de planta enriquecido de la columna utilizando una mezcla de etanol/agua que tiene una relación (%) de aproximadamente 95/5 de etanol/agua (v/v) a aproximadamente 100/0 de etanol/agua (v/v), preferiblemente de aproximadamente 96/4, 97/3, 98/2, 99/1 o 100/0 de etanol/agua (v/v), de manera más preferida de aproximadamente 96/4 de etanol/agua (v/v).

50 Cualquiera de las alternativas mencionadas anteriormente se puede combinar entre sí. Particularmente, se pueden combinar procesos de extracción industriales EP o EM (o los procesos de extracción en laboratorio) con procesos de purificación industriales PF o PS, según corresponda.

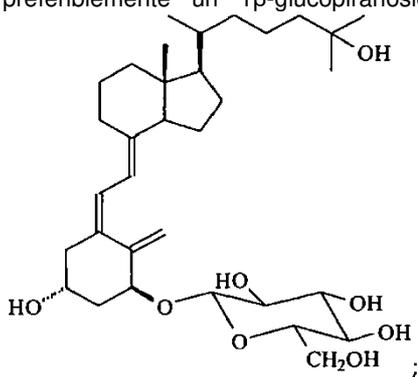
Extractos de planta enriquecidos

La presente invención se dirige además a un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* como un producto directo del método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* tal como se definió anteriormente, es decir, obtenido u obtenible por el método de

la invención tal como se definió anteriormente. Un extracto de planta enriquecido de este tipo se caracteriza específicamente por su composición específica y ventajosa, que solo se puede obtener utilizando las características específicas según el método anterior de la invención. Más particularmente, un extracto de planta enriquecido de este tipo obtenido directamente u obtenible utilizando el método anterior de la invención, preferiblemente muestra la siguiente composición:

• Como ingredientes activos:

- Metabolitos de vitamina D₃ en una concentración de preferiblemente al menos 300 µg/g, preferiblemente superior a 500 µg/g, incluso más preferiblemente superior a 2000 µg/g de vitamina D₃ activa, preferiblemente determinada analíticamente como 1,25-dihidroxitamina D₃ total, preferiblemente presente como un glucósido o una mezcla de diferentes glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ o más preferiblemente un 1β-glucopiranosido de 1,25-dihidroxitamina D₃ con la siguiente fórmula (I):



y

- Glucósidos de quercetina activos de al menos 100 mg/g, preferiblemente al menos 150 mg/g, y de manera más preferida de al menos 200 mg/g, determinados como quercetina después de hidrólisis ácida.

• Componentes inactivos

Opcionalmente, el extracto de planta enriquecido de la invención obtenido por el método de la invención se puede caracterizar además por los siguientes contenidos:

- Materia inorgánica:	preferiblemente un máximo de un 6% (que comprende los elementos Ca, K, Mg y S en el intervalo de un 0,1 a un 1% y los elementos Br, Cl, P, Si, Al, Na, Cu, Fe, Zn en el intervalo de menos de un 0,1%);
- Carbohidratos:	preferiblemente entre un 50-75%;
- Proteínas:	preferiblemente menos de un 2% (lo que reduce significativamente la aparición de alergias);
- Grasa:	preferiblemente menos de un 2%;

• Componentes tóxicos

El extracto de planta enriquecido de la invención obtenido por el método de la invención se puede caracterizar adicionalmente por un nivel bajo de alcaloides. Esto es particularmente notable y ventajoso, porque las plantas del género *Solanum* se conocen por contener alcaloides tóxicos, particularmente solasodina en *Solanum glaucophyllum*: Por consiguiente, el extracto de planta enriquecido de la invención obtenido por el método de la invención se puede caracterizar adicionalmente por alcaloides por debajo de un límite de detección de 10 µg/g (particularmente solasodina);

Un extracto de planta enriquecido de este tipo obtenido por el método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* tal como se definió anteriormente proporciona, entre otras, las siguientes propiedades químicas superiores a extractos de la técnica:

- La aparición de contenido enriquecido de ambos principios activos, que representan dos clases de componentes óseos activos: 1,25-dihidroxitamina D₃ y el flavonol quercetina, ambos en forma ligada glucosídica;

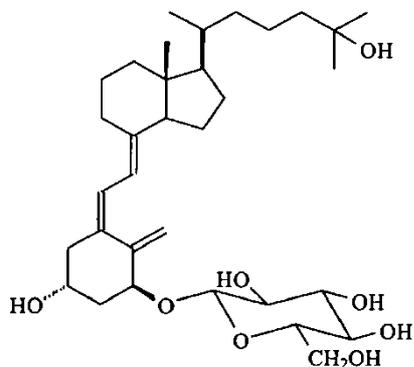
- Una solubilidad en agua intrínseca, que permite una formulación simple, no complicada, donde no es necesaria la adición de detergente;
- Bajo pardeamiento/decoloración (ya que se ha encontrado que las reacciones de pardeamiento/decoloración son indeseables porque reducen el contenido de fenoles vegetales tales como flavonoles).

El extracto de planta enriquecido obtenido por el método de la invención proporciona también, entre otras, las siguientes propiedades biológicas superiores a extractos de la técnica:

- Una actividad alta de vitamina D, debido únicamente al principio más activo 1,25-dihidroxitamina D₃;
- Una tolerancia biológica superior del 1β-glucopiranosido de 1,25-dihidroxitamina D₃ de la fórmula (I) sobre el compuesto original 1,25-dihidroxitamina D₃ debido a su estructura glucósida (que actúa como una forma profármaco del metabolito endógeno de vitamina D activo 1,25-dihidroxitamina) D₃;
- Un acceso más rápido del efecto terapéutico en comparación con la vitamina D₃ sola;
- Una apertura significativa del margen terapéutico debido a la presencia de un contenido enriquecido de los dos principios óseos activos, los glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ y flavonoles, particularmente glucósidos de quercetina en el extracto de planta de la invención, que reduce el riesgo de hipercalcemia;
- El extracto de planta de la invención muestra propiedades superiores para aliviar la cojera y mejorar la resistencia ósea en animales productores de carne;
- El extracto de planta de la invención es altamente activo en la mejora de la calidad de la cáscara de huevo;
- El extracto de planta de la invención es también altamente activo en la prevención de un descenso del calcio en sangre durante el parto (fiebre de la leche);
- Además, el extracto de planta de la invención es altamente activo en un modelo preclínico de rata aceptado por la FDA para osteoporosis humana. En un experimento, en el cual se aplicó un extracto no purificado de *Solanum glaucophyllum* a ratas hembra ovariectomizadas (un modelo animal que estimula la osteoporosis posmenopáusic humana), mostró efectos antiosteoporóticos pero también depósitos en tejidos blandos, donde el extracto purificado del mismo contenido de vitamina D y obtenido por el método de la invención, tal como se describió anteriormente, mostró un efecto antiosteoporótico pero no calcificación del tejido blando.

Con base en los sorprendentes resultados anteriores, una realización de la presente invención se dirige también a una composición (sintética) de extracto de planta, preferiblemente que comprende los siguientes componentes:

- a) Un componente de vitamina D activo, preferiblemente un metabolito de vitamina D 1-alfa-hidroxi sustituido o más preferiblemente 1,25-dihidroxitamina D₃ en forma libre o ligada glucosídica de una fuente natural o sintética, preferiblemente determinada como 1,25-dihidroxitamina D₃ total, más preferiblemente presenta un glucósido o una mezcla de diferentes glucósidos de 1,25-dihidroxitamin D₃, o más preferiblemente un 1β-glucopiranosido de 1,25-dihidroxitamina D₃ con la siguiente fórmula (I):



preferiblemente en una concentración de al menos 300 µg/g, preferiblemente superior a 500 µg/g, incluso más preferiblemente superior a 2000 µg/g de vitamina D₃ activa, y

b) al menos un flavonol (activo) en una concentración de al menos 100 mg/g, más preferiblemente de al menos 150 mg/g, y de manera más preferida de al menos 200 mg/g.

En el contexto de la presente invención, los flavonoles, contenidos en la composición de extracto de planta (sintética) de la invención, se pueden seleccionar de entre cualquier flavonol o sus glucósidos conocidos en la técnica, preferiblemente de entre flavonoles o sus glucósidos conocidos que tienen un efecto terapéutico beneficioso en el crecimiento óseo. Los flavonoles de este tipo se pueden seleccionar de entre compuestos que incluyen miricetina, quercetina, kaempferol, fisetina, isorhamnetina, paquipodol, rhamanazina, patuletina, eupalitina, eupatolitina, 5-hidroxi-7-metoxiflavona, 6-hidroxi-7-metoxiflavona, 7-hidroxi-7-metoxiflavona, 5-hidroxi-7-metoxiflavona, 7-hidroxi-5-metilflavona, o sus glucósidos, etc. Más preferiblemente, los flavonoles, contenidos en la composición (sintética) de extracto de planta de la invención, se pueden seleccionar de entre glucósidos de los flavonoles anteriores, por ejemplo, de glucósidos de miricetina, quercetina, kaempferol, fisetina, isorhamnetina, paquipodol, rhamanazina, patuletina, eupalitina, eupatolitina, 5-hidroxi-7-metoxiflavona, 6-hidroxi-7-metoxiflavona, 7-hidroxi-7-metoxiflavona, 5-hidroxi-7-metoxiflavona, 7-hidroxi-5-metilflavona, etc., en particular, preferiblemente de entre quercetina y sus glucósidos.

Composiciones farmacéuticas

Según otra realización específica, la presente invención se dirige también a una composición farmacéutica que comprende:

15 a) un extracto de planta enriquecido de la invención tal como se definió anteriormente de una composición de planta (sintética) tal como se definió anteriormente (o componentes del extracto de planta, particularmente glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ y flavonoles, más particularmente glucósidos de quercetina, tal como se definió anteriormente);

b) opcionalmente un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 La composición farmacéutica de la invención puede comprender a) una composición de planta (sintética), o sus componentes, tal como se definió anteriormente, preferiblemente en las concentraciones anteriores.

La composición farmacéutica de la invención puede comprender además b) un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. En el contexto de la presente invención, el portador o vehículo farmacéuticamente aceptable de la composición farmacéutica de la invención se refiere típicamente a un portador o vehículo no tóxico que no destruye la actividad farmacológica de los componentes del extracto de planta, particularmente de los glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ y flavonoles, más particularmente glucósidos de quercetina, con los que se formula.

Los portadores o vehículos farmacéuticamente adecuados, que se pueden utilizar en la composición farmacéutica de la invención, se pueden distinguir típicamente en portadores o vehículos sólidos o líquidos, donde una determinación específica puede depender de la viscosidad del portador o vehículo respectivo que se va a utilizar.

En este contexto, los portadores o vehículos sólidos incluyen típicamente, por ejemplo, pero no se limitan a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, y sales, si se proporcionan en forma sólida, tal como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, o polivinilpirrolidona, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxiopropileno, lanolina, azúcares, tales como, por ejemplo, lactosa, glucosa y sacarosa, excipientes tales como maltodextrina, xilitol, almidón, incluidos, por ejemplo, almidón de maíz o fécula de patata, o sustancias basadas en celulosa, por ejemplo, celulosa y sus derivados, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa, acetato de celulosa, tragacanto, malta, gelatina, sebo, lubricantes (sólidos), tales como, por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio, sulfato de calcio, agentes humectantes, tales como, por ejemplo, lauril sulfato sódico, agentes colorantes, agentes aromatizantes, portadores (de agente activo) de fármaco, agentes formadores de comprimidos, estabilizadores, antioxidantes, conservantes, recubrimientos.

Los portadores o vehículos líquidos, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas, incluyen típicamente, pero no se limitan a, por ejemplo, agua, agua libre de pirógenos, disoluciones de intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, o proteínas séricas, tales como albúmina de suero humano, ácido algínico, disoluciones salinas isotónicas o disoluciones tamponadas con fosfato, soluciones de Ringer, disoluciones de cloruro de sodio isotónicas, etc. o sales o electrolitos, si se proporcionan en forma solubilizada, tales como sulfato de protamina, fosfatos, por ejemplo, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro sódico, sales de zinc, u (otras) sustancias tamponadoras, incluidos, por ejemplo, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, disoluciones líquidas de polioles, tales como, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, glicerol, 1,3-butanodiol, sorbitol, manitol, aceites fijos estériles, cualquier aceite fijo suave adecuado, por ejemplo, incluidos mono o diglicéridos sintéticos, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéricos, aceites farmacéuticamente aceptables naturales, por ejemplo, aceites de plantas, tales como, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de maíz, aceite de *Theobroma*, aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxiethyladas. Estos portadores o vehículos líquidos pueden contener o comprender también diluyentes o dispersantes de alcoholes de cadena larga, tales como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares, o tensoactivos o emulsionantes comúnmente utilizados, tales como Tween®, Span u otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad, etc., si se proporcionan en forma líquida.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar por vía oral, rectal, o por medio de un depósito implantado u opcionalmente por vía parenteral.

Preferiblemente, la composición farmacéutica de la invención, tal como se definió anteriormente, se puede administrar por vía oral (o rectal) en cualquier forma de dosis oral (o rectal) aceptable incluidos, pero no se limitan a, cápsulas, comprimidos, suspensiones o disoluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los portadores comúnmente utilizados incluyen lactosa y almidón de maíz. Típicamente, se añaden también agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Si se desea, se pueden añadir también ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes. Para administración por vía oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Para preparar cápsulas, particularmente los portadores y vehículos que se pueden utilizar preferiblemente se seleccionan de entre excipientes tales como maltodextrina, xilitol, almidón, incluidos, por ejemplo, almidón de maíz o fécula de patata, etc. Para preparar comprimidos, particularmente los portadores y vehículos que se pueden utilizar preferiblemente se seleccionan de entre lubricantes, incluidos, por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio, excipientes tales como maltodextrina, xilitol, almidón, incluidos, por ejemplo, almidón de maíz o fécula de patata; y recubrimientos adecuados para comprimidos, etc. Se conciben también formas retardadas de estos comprimidos y cápsulas, es decir, una forma de liberación retardada, donde la forma retardada preferiblemente comprende los principios activos, tal como se mencionó anteriormente, incrustados en un biopolímero biodegradable o donde los principios activos, tal como se mencionó anteriormente, se envuelven con un recubrimiento (para liberación lenta), que permite una difusión controlada de los principios activos. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo puede, por ejemplo, combinarse con agentes emulsionantes o de suspensión. Las formulaciones de este tipo se pueden utilizar también para administración por vía rectal o para administración por medio de un depósito implantado.

La composición farmacéutica de la invención comprende típicamente una "cantidad segura y eficaz" de al menos uno de ambos principios principales, los glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ y flavonoles, más particularmente glucósidos de quercetina, tal como se define en este documento. Tal como se utiliza en este documento, una "cantidad segura y eficaz" significa una cantidad de estos principios principales que es suficiente para inducir significativamente una modificación positiva de una enfermedad o trastorno tal como se define en este documento. Al mismo tiempo, sin embargo, una "cantidad segura y eficaz" es suficientemente pequeña para evitar efectos secundarios graves, es decir, para permitir una relación razonable entre ventaja y riesgo. La determinación de estos límites se encuentra típicamente dentro del alcance de un criterio médico razonable. Una "cantidad segura y eficaz" de ambos principios principales, los glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ y flavonoles, más particularmente glucósidos de quercetina, tal como se define en este documento, variarán además en relación con el estado particular que se va a tratar y también con la edad y el estado físico del paciente que se va a tratar, el peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, tasa de excreción, combinación farmacológica, la gravedad del estado, la actividad de la proteína y/o anticuerpo autoantigénico específico utilizado, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia de acompañamiento, el portador farmacéuticamente aceptable particular utilizado, dentro del conocimiento y experiencia del médico acompañante. La composición farmacéutica de la invención se puede utilizar para usos médicos humanos y también veterinarios.

Aplicaciones del extracto de planta de la invención de *Solanum glaucophyllum* de la composición farmacéutica de la invención

La composición farmacéutica de la invención, el extracto de planta enriquecido de la invención, obtenido u obtenible por el método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* tal como se definió anteriormente, la composición de extracto de planta (sintética) de la invención, o ambos principales componentes del extracto de planta enriquecido de la invención o de la composición de extracto de planta (sintética) de la invención, es decir, ambos glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ y flavonoles, particularmente glucósidos de quercetina, tal como se definió anteriormente, se pueden administrar a un ser humano o a un animal que los necesite para tratar cualquier enfermedad tal como se define en este documento, en particular:

- enfermedades relacionadas con la reducción de masa ósea, por ejemplo, osteopenia u osteoporosis (senil o posmenopáusica), particularmente en seres humanos;
- discondroplasia tibial u otros problemas de las patas relacionados con mineralización ósea, preferiblemente en aves de corral, más preferiblemente en pollos, pavos, gansos y patos;
- paresia hipocalcémica relacionada con la parición, también conocida como paresia puerperal en animales productores de leche o fiebre de la leche, particularmente en ganado y otros animales productores de leche. Esto implica también cualquier enfermedad relacionada con un descenso del calcio en plasma durante el parto en ganado y otros animales productores de leche. En este contexto, la fiebre de la leche es una enfermedad metabólica en animales productores de leche relacionada con la parición, cuando reconstituir la producción de leche agota el calcio circulante en la sangre de la madre. La homeostasis del calcio endógeno no es capaz de movilizar suficiente calcio del alimento o hueso para prevenir una caída del calcio en sangre. En ciertos casos, la concentración baja de calcio induce paresia muscular. Los tratamientos actuales consisten en aplicar grandes dosis de calcio alrededor del parto (véase The Merck

Veterinary Manual, Parturient Paresis in Cows), que es inferior a la aplicación de los extractos de planta de la invención.

5 La administración para cualquiera de las enfermedades tal como se define en este documento puede suceder tal como se describió anteriormente para la composición farmacéutica de la invención, particularmente los modos de administración y la cantidad segura y eficaz que se va a administrar.

10 Por consiguiente, otra realización de la presente invención se dirige también al uso de un extracto de planta enriquecido de la invención, obtenido u obtenible por el método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum*, tal como se definió anteriormente, el uso de una composición de extracto de planta (sintética) de la invención, o el uso de ambos componentes principales del extracto de planta enriquecido de la invención o de la composición de extracto de planta (sintética) de la invención, es decir, ambos glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ y flavonoles, particularmente glucósidos de quercetina, tal como se definió anteriormente, para preparar una composición farmacéutica (de la invención) para la prevención o tratamiento de una enfermedad o estado tal como se define en este documento, particularmente prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas con la reducción de masa ósea, es decir, osteopenia u osteoporosis (senil o posmenopáusica), particularmente en seres humanos, particularmente prevención o tratamiento de osteopenia durante la edad adulta en seres humanos, o prevención y tratamiento de osteopenia en animales de compañía, prevención y tratamiento de discondroplasia tibial y otros problemas de las patas relacionados con la mineralización ósea, incluidos mejora de la masa ósea y resistencia a la rotura, preferiblemente en aves de corral, más preferiblemente en pollos, pavos, gansos y patos; mejora de la resistencia de la cáscara de huevo y grosor en aves de corral, potenciación de la absorción de calcio y fosfato en aves de corral y cerdos y, por lo tanto, reducción o prevención de descarga (aumentada) de fósforo a la orina y estiércol, paresia hipocalcémica alrededor de la parición, también conocida como paresia puerperal en animales productores de leche o fiebre de la leche, particularmente en ganado y animales productores de leche. Esto implica también cualquier enfermedad relacionada con un descenso del calcio en plasma durante el parto en ganado y otros animales productores de leche, etc.

25 Otra realización de la presente invención se dirige al uso del extracto de planta enriquecido de la invención, obtenido u obtenible por el método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* tal como se definió anteriormente, el uso de la composición de extracto de planta (sintética) de la invención, o el uso de ambos principales componentes del extracto de planta enriquecido de la invención o de la composición de extracto de planta (sintética) de la invención, es decir, tanto glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ como flavonoles, particularmente glucósidos de quercetina, tal como se definió anteriormente, como suplemento dietético para uso humano o veterinario. Un suplemento dietético de este tipo se puede administrar sin aparición o detección de un estado patológico de cualquiera de las enfermedades mencionadas anteriormente, tales como osteopenia u osteoporosis, discondroplasia tibial, paresia puerperal en animales productores de leche o fiebre de la leche, etc., es decir, por razones no terapéuticas o como profilaxis para las enfermedades anteriores.

35 Finalmente, la presente divulgación se refiere también a un equipo, particularmente a un equipo de partes, que comprende el extracto de planta enriquecido de la invención, obtenido u obtenible por el método de la invención para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* tal como se definió anteriormente, la composición de extracto de planta (sintética) de la invención, o ambos principales componentes del extracto de planta enriquecido de la invención, es decir, tanto glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ como flavonoles, particularmente glucósidos de quercetina, tal como se definió anteriormente, y/o la composición farmacéutica de la invención, y opcionalmente instrucciones técnicas o un manual de instrucciones, preferiblemente para cualquiera de los usos, tratamientos o terapias mencionados anteriormente.

Ventajas de la presente invención

45 La presente invención proporciona de manera ventajosa un método para preparar y purificar un extracto de planta enriquecido a partir de *Solanum glaucophyllum* tal como se definió anteriormente, que permite la provisión enriquecida de dos principios activos separados, glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ (incluidos los 1β-glucopiranosidos de 1,25-dihidroxitamina D₃) y flavonoles, particularmente glucósidos de quercetina. El extracto de planta enriquecido de la invención a partir de *Solanum glaucophyllum*, tal como se definió anteriormente, es sorprendentemente activo, tal como se probó en un modelo preclínico científicamente aceptado para osteoporosis posmenopáusica humana. Esto también es capaz de mantener la concentración de metabolito de vitamina D activo esencial y, por lo tanto, es adecuada para sujetos con insuficiencia renal. El extracto de planta enriquecido de la invención es también sorprendentemente activo para potenciar la absorción de calcio y fósforo en animales, mejorando la masa ósea y la resistencia a la rotura, previniendo discondroplasia tibial en aves de corral y previniendo un descenso en la concentración de calcio en plasma durante el parto en ganado, conocido como paresia puerperal en animales productores de leche. En particular, la composición de extracto de planta enriquecido de la invención es ventajosa debido a un contenido enriquecido de los dos principios activos, glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ (incluidos los 1β-glucopiranosidos de 1,25-dihidroxitamina D₃) y flavonoles, particularmente glucósidos de quercetina., que amplían sorprendentemente el margen terapéutico que antes era extremadamente pequeño conocido para 1,25-dihidroxitamina D₃. Esto da al extracto de planta enriquecido una tolerancia sorprendentemente mejor que la del metabolito de vitamina D₃ libre solo. Además, reduce el riesgo de hipercalcemia en comparación al compuesto 1,25-dihidroxitamina D₃ (mostrado en modelos animales) utilizado solo en pequeñas

5 concentraciones en uso clínico y permite así que sea más seguro en seres humanos que lo mostrado para el compuesto original solo. También se ha encontrado que el inicio de la respuesta biológica de ambos principios activos de la presente composición es más rápido en comparación con la vitamina D sola, lo que se puede deber a la presencia de 1,25-dihidroxitamina D₃ y 1β-glucopiranosidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ en el extracto de planta enriquecido de la invención, tal como se ha encontrado. Finalmente, no hay componentes tóxicos detectables unidos a la materia prima vegetal contenidos en la composición vegetal enriquecida de la invención. El extracto de planta enriquecido de la invención a partir de *Solanum glaucophyllum*, tal como se definió anteriormente, tiene también un bajo grado de decoloración, y un bajo potencial alérgico debido al bajo contenido de proteínas.

Figuras:

10 Se pretende que las siguientes figuras ilustren la invención adicionalmente. No se pretende que limiten la materia de la invención a estas.

La Figura 1 muestra las medidas que influyen en la masa ósea en el contexto de osteoporosis entre hombres y mujeres. Como se puede ver, la nutrición es el factor más importante a lo largo de toda la vida. La medicación específica tiene un papel importante en pacientes con una edad superior a 45 años.

15 La Figura 2 muestra la caracterización del extracto de planta enriquecido de la invención, utilizando una separación cromatográfica del extracto purificado en una columna de Sephadex G25 analítica. Se aplicaron partes alícuotas de la fracción a la hidrólisis y se evaluaron para 1,25-dihidroxitamina D₃. Se utilizó poliestireno soluble en agua con 1400, 4300 y 6800 Dalton como marcador de masa. Como se puede ver en la Figura 2, la 1,25-dihidroxitamina D₃ representa un componente principal del extracto de planta enriquecido de la invención.

20 La Figura 3 muestra la caracterización del extracto de planta enriquecido de la invención, utilizando una separación cromatográfica diferente del extracto purificado en una columna de Superdex-30 analítica. Se aplicaron partes alícuotas de la fracción a la hidrólisis y se evaluaron para 1,25-dihidroxitamina D₃. Se utilizó cobalamina con una masa molecular de 1355 Dalton como marcador de masa. Como se puede ver en la Figura 3, la 1,25-dihidroxitamina D₃ representa un componente principal del extracto de planta enriquecido de la invención.

25 La Figura 4 muestra la eficacia de la extracción calculada por la siguiente fórmula:

$$y_f = \text{VDM}_{(\text{extracto})} * [\text{Qu}_{(\text{extracto})}/1000] * e_f$$

Como resultado de los experimentos en laboratorio, el factor de bondad obtuvo dos óptimos, que son aplicables también a procesos a escala industrial.

30 La Figura 5 muestra la estructura del componente 1,25-dihidroxitamina D₃ tal como se reveló por espectros UV, ¹H-NMR y ¹³C-NMR.

La Figura 6 muestra una caracterización cromatográfica de capa fina de alto rendimiento de la preparación obtenida y una comparación con estándares y con un ginkgo y un extracto de espino (véase el Ejemplo 3 (III)). Las condiciones son las siguientes:

placas:	gel de sílice G con indicador UV 10x10cm Merck (Camag AG, Muttenz Suiza)	
Disolvente:	acetato de etilo/ácido fórmico/ácido acético/agua (100+11+11+26). preacondicionamiento de 45 minutos, duración del ensayo 45 minutos	
Detección:	reactivo Naturstoff (Camag AG, Muttenz Suiza)	
Aplicación:		
	Línea 1:	quercetina (rf 0,88; 0,56 µg); hiperósido (rf 0,55; 1,25 µg); ácido clorogénico (rf 0,42; 1,2 µg); rutina (rf 0,37; 0,73 µg)
	Línea 2:	kaempferol (rf 0,90; 0,25 µg); isoquercitrina (rf 0,57; 1,25 µg); hiperósido (rf 0,54; 1,25 µg);
	Línea 3:	ácido cafeico (rf 0,82; 0,1 µg); isoquercitrina (rf 0,57; 1,25 µg)
	Línea 4:	extracto purificado (Tanda 1; 41 µg; se indican quercetina y glucósidos de quercetina)

	Línea 5:	extracto purificado (Tanda 2; 41 µg; se indican quercetina y glucósidos de quercetina)
	Línea 6:	extracto de ginkgo biloba (producto comercial; 10 µl)
	Línea 7:	extracto de espino (producto comercial; 201 µg)
	Línea 8:	Estándares idénticos a la línea 1
	Línea 9:	extracto comparativo purificado según la técnica (cromatografía en Sephadex G-10) (muestra comparativa de un extracto purificado en una columna de Sephadex G10). A pesar de la alta tasa de enriquecimiento de la actividad de la vitamina D (2000 µg/g), virtualmente, no hay flavonoles presentes.

5 La Figura 7 muestra la progresión del calcio en plasma durante el parto (paresia puerperal). La primera columna muestra el extracto de planta purificado de la invención (extracto purificado), la segunda columna muestra el tratamiento con una sal de calcio como una aplicación en bolo (Bovicalc, Boehringer Ingelheim, Alemania, aplicada según las instrucciones de los fabricantes). Como se puede ver, ambos tratamientos pueden prevenir una caída del calcio en plasma por igual (con niveles ligeramente mejores de calcio con el extracto de planta purificado de la invención (extracto purificado) que con el estándar de calcio). Una caída de calcio en plasma es inevitable sin tratamiento tal como se puede ver en la Figura 7.

Las columnas representan:

- 10 a.p: 24 horas antes del parto,
 pp: a la parición (parto);
 más-12: 12 horas después del parto;
 más-72: 72 horas después del parto;

15 La Figura 8 representa el curso del calcio en plasma alrededor del parto en vacas no tratadas. La Figura 9 muestra la masa ósea de la tibia derecha después de 6 meses de tratamiento en un modelo de rata para osteoporosis (véase también el Experimento 4). Como se puede ver, el tratamiento con la composición de la invención no solo evitó pérdida ósea inducida por ovariectomía, sino que la composición aumentó la masa ósea en la tibia en comparación con los controles operados de forma simulada.

Ejemplos

20 Se pretende que los siguientes Ejemplos ilustren la invención adicionalmente. No se pretende que limiten la materia de la invención a estas.

Ejemplo 1 - Extracción

25 De los métodos de extracción publicados para *Solanum glaucophyllum*, la extracción con cloroformo-metanol fue el procedimiento más eficaz, sin embargo, el método no es utilizable para volúmenes mayores e implica reactivos tóxicos. El otro método de extracción publicado con agua produce una actividad de vitamina D inferior y es, por lo tanto, también inferior al método de la presente invención. En contraste, la presente invención proporciona un proceso optimizado técnicamente y ecológico para la extracción y purificación, preferiblemente de hojas secas, de la planta *Solanum glaucophyllum* sin el uso de reactivos tóxicos tal como se describe en el Ejemplo 1

Ejemplo 1A - Extracción a escala de laboratorio (Proceso L)

30 Se sometió 1 g de hojas secas molidas de *Solanum glaucophyllum* a una extracción con disolventes automatizada con un instrumento ASE-100 (Dionex, EE. UU.). Como disolventes, se utilizaron los siguientes disolventes basados en alcohol y se obtuvieron las masas (véase la Tabla 1).

35

Disolvente en v/v ¹⁾	Relación de disolvente	Extracto [ml/g material de planta en bruto]	Rendimiento [mg/g SC] ²⁾ temperatura 50°C media de 3 exp.	VDM [μ g/g SG] ³⁾	Qu [mg/g SG] ⁴⁾	Relación VDM/Qu [μ g/mg SG]	VDM [$10(-3)$ μ /m extracto] = ppm	Qu [$10(-6)$ mg extracto] = ppm	ef ⁵⁾	Yf = VDM * (Qu/100) * ef
EtOH/H ₂ O	100%	23,1	88	1,3	1,0	1,3	14,5	12	1	0,2
EtOH/H ₂ O	85%	22,1	197	8,2	6,4	1,3	41,8	33	1	1,4
EtOH/H ₂ O	75%	21,8	247	20,1	8,5	2,4	81,1	34	1	2,8
EtOH/H ₂ O	65%	22,3	311	23,1	8,8	2,6	74,3	28	2	4,2
EtOH/H ₂ O	50%	22,1	352	20,7	9,1	2,3	58,7	26	2	3,0
EtOH/H ₂ O	35%	22,3	313	20,6	7,3	2,8	65,6	23	2	3,1
EtOH/H ₂ O	25%	24,0	371	24,6	8,8	2,8	66,3	24	2	3,4
EtOH/H ₂ O	0%	23,3	315	16,8	5,8	2,9	53,5	19	1	1,0
MeOH	100%	23,0	189	16,6	6,2	2,7	88,0	33	1	2,9
MeOH	65%	17,9	340	19,1	9,9	1,9	56,2	29	2	3,3
MeOH	25%	18,6	354	19,8	9,1	2,2	55,8	26	1	1,4
2-Propanol	100%	17,7	124	2,1	2,2	1,0	17,1	18	1	0,3
2-Propanol	65%	17,9	326	19,1	6,3	3,0	58,4	19	2	2,3
2-Propanol	25%	18,0	363	17,5	4,9	3,6	48,2	13	1	0,6
n-butanol	100%		70	1,4	3,6	0,4	19,9	51	1	1,0

extracción: 1) modelo ASE-100 de Dionex Instruments, Olten Suiza en las siguientes condiciones: 5 ciclos de extracción a una temperatura de 50°C

rendimiento: 2) mg de extracto seco por g de materia prima

5 VDM: 3) VDM tal como se determina analíticamente por ensayo de 1,25-dihidroxivitamina D₃ después de hidrólisis

Qu: 4) Glucósidos de quercetina después de hidrólisis ácida según la Ph.Eur.

ef 5) factor de proceso empírico

yf 6) bondad ponderada del proceso, fórmula $yf = VDM * [Qu/1000] * ef$

La eficacia de la extracción se calculó con la siguiente fórmula:

10 $yf = VDM_{(extracto)} * [Qu_{(extracto)}/1000] * ef$

donde los términos [VDM] y [Qu] se calculan por g de extracto. El factor [ef] pondera factores empíricos tales como costes, ecología y calidad del extracto (por ejemplo, solubilidad). Como resultado de los experimentos en laboratorio, el factor de bondad obtenido se presenta como una gráfica en la Figura 4.

15 Los dos picos obtenidos a partir de la gráfica en la Figura 4 según la función anterior describen los méritos del proceso, los cuales cumplen los criterios de la presente invención y son satisfactorios y superiores a los métodos de extracción conocidos. La extracción con otros disolventes adecuados y utilizados ampliamente es menos favorable para obtener la composición óptima de producto.

5 El pico a una mezcla de disolvente de etanol/agua de 25/75 es de especial interés, porque el extracto seco posee una excelente solubilidad en agua, lo que hace que un extracto de este tipo sea adecuado para cualquier administración por vía oral, por ejemplo, por medio de agua potable sin la necesidad de aplicar emulsionantes (como es lo normal para las vitaminas liposolubles). El extracto obtenido con etanol/agua 65/35 tiene una solubilidad en agua inferior y se puede utilizar en, por ejemplo, formulaciones no solubles en agua, por ejemplo, cuando se utilizan emulsionantes, pero también en otras formas, tales como comprimidos, cápsulas, etc., sin la necesidad de emulsionantes.

10 Como resultado de los experimentos, la eficacia de la extracción yf mayor que 3 es satisfactoria y superior a métodos de extracción conocidos y cumple los criterios de la presente invención. La extracción con otros disolventes adecuados y utilizados ampliamente es menos favorable para obtener la composición óptima de producto.

Los datos obtenidos de la purificación del extracto obtenido del proceso en laboratorio EL son los siguientes:

Proceso EL		EtOH/H ₂ O:25/75						
		masa g	contenido ppm	producto [m*c]	rendimiento masa k/k	de	factor de purificación VDM	% rendimiento
Materia prima	entrada	1	18	18	-		-	
Extracto	salida	0,371	47	17	0,37		2,6	97%

Ejemplo 1B - Extracción a escala industrial

I) Proceso EP

15 Se extrajeron 1000 kg de hojas secas de *Solanum glaucophyllum* (5-15% de contenido de agua) con 15-30'000 litros (preferiblemente 25'000) de un 25/75 por ciento de una mezcla de etanol/agua (v/v), que contuvo un 0,1% de ácido ascórbico como estabilizador. Se realizó percolación en 4 recipientes rellenos cíclicamente a 55°C durante 24 horas por ciclo en una planta del estado de la técnica a un caudal de 1000 litros/hora.

20 El pH de la fase líquida recibida se controló y finalmente se ajustó a pH 5,5-6,5 mediante la adición de ácido acético. Se recogió el extracto obtenido y se concentró al vacío hasta un contenido de un 35% de materia no volátil. Se llevó a cabo un tratamiento a temperatura alta tal como se describe anteriormente. Los datos obtenidos de la purificación del extracto obtenido del proceso EP son los siguientes:

Proceso EP		EtOH/H ₂ O:25/75						
		Masa kg	contenido ppm	producto [m*c]	rendimiento masa kg/kg	de	factor de purificación VDM	% rendimiento
Materia prima	entrada	3308	28	92'624	-		-	
Extracto	salida	933	76	70'908	0,28		2,7	77%

II) Proceso EM

25 En vez de percolación, también se puede utilizar un proceso de maceración. Por lo tanto, se rellenan 1000 kg de hojas secas en un reactor de acero inoxidable apropiado con un mezclador y un sistema de calefacción de doble capa. Se añadieron 9'000 litros de etanol-agua (40-80% p/p, que podía contener un 0,1% de ácido ascórbico). La mezcla se calentó a 40-75°C (preferiblemente 55) durante 6-48 horas (preferiblemente 24) con agitación seguido de una separación de líquido/sólido en un filtro prensa. Las hojas aisladas se extrajeron una segunda vez en el mismo procedimiento utilizando 8'000 litros de mezcla de disolvente.

30

ES 2 702 987 T3

Se filtró el extracto, se ajustó el pH a 5,5-6,5 con ácido acético y se concentró en una unidad de evaporación al vacío en dos etapas hasta un contenido de un 25-50% de materia no volátil. Se llevó a cabo un tratamiento a temperatura alta tal como se describió anteriormente. Los datos obtenidos del proceso EM son los siguientes:

Proceso EM		EtOH/H ₂ O:25/75							
		Masa kg	contenido ppm	producto [m*c]	rendimiento masa kg/kg	de	factor de purificación VDM	de	% rendimiento
Materia prima	entrada	200	26	5'200	-		-		
Extracto	salida	69,2	67	4'702	0,35		2,6		90%

5 III) Procesos EP+EM

Se sometieron ambos extractos concentrados de I) y II) (Procesos EP y EM) a un tratamiento a temperatura alta tal como se definió anteriormente y se utilizaron para la siguiente etapa directamente o se secaron por atomización, por banda o liofilizaron.

Ejemplo 2 - Purificación

10 Ejemplo 2A - Purificación a escala de laboratorio (Proceso PL)

Se disolvieron aproximadamente 300 mg de extracto en bruto en 1 ml de agua (o una disolución de aproximadamente un 30% (p/v)) y se aplicaron en una columna de 9 ml de volumen de lecho, rellena con la resina que se iba a probar (la columna se preacondicionó según sus especificaciones). Todas las disoluciones se aplicaron con un caudal de aproximadamente 0,3 volúmenes de lecho por minuto. La columna se lavó con 3 volúmenes de lecho de agua. Se realizó la elución con 3 volúmenes de lecho de etanol/agua 95/05 (v/v) y se recogieron los eluyentes para análisis. Las columnas se regeneraron con 3 volúmenes de lecho de acetona. Las tres fracciones, lavado con agua (D105/1A), elución con etanol (D105/1B) y regeneración con acetona (D105/1C), se recogieron, evaporaron hasta secarse y se analizaron. La columna se acondicionó con 2 volúmenes de lecho de etanol, seguido de 2 volúmenes de lecho de etanol al 50% y 4 volúmenes de lecho antes de reutilización.

20 Purificación de proceso en laboratorio (PL), la tabla describe todos los datos experimentales obtenidos en cuatro ensayos:

- Ensayo 1: un extracto obtenido con disolvente etanol/agua 25/75 (v/v) y columna de Amberlite XAD1180
- Ensayo 2: un extracto obtenido con disolvente etanol/agua 25/75 (v/v) y columna de Amberlite XAD7HP
- Ensayo 3: un extracto obtenido con disolvente etanol/agua 65/35 (v/v) y columna de Amberlite XAD1180
- Ensayo 4: un extracto obtenido con disolvente etanol/agua 65/35 (v/v) y columna de Amberlite XAD7HP

Todos los ensayos se recogieron en las 3 fracciones: lavado con agua (A), eluato (B) y regenerado (C) según la descripción del método anterior.

Los datos obtenidos del proceso PL son los siguientes:

30

fracción	extracto en bruto ¹⁾	Apl. Mg ²⁾	Insol mg ³⁾	Tipo de columna	masa mg/gm ⁴⁾	VDM ⁵⁾ µg/g rm	Qu ⁶⁾ mg/g rm	rendimiento de masa %	VDM ppm en e ⁷⁾	Rendimiento ⁸⁾ VDM	Qu mg/g en e ⁹⁾	Rendimiento ¹⁰⁾ Qu	VDM/Qu [$\cdot 10^{-3}$] ¹¹⁾
1A (lavado)	25/75	329		Amberlite XAD1180	235	0,8	0,02	71%	3		0,1		
1B (eluato)	"				54	14,3	5,36	16%	266	78%	99,7	99%	2,67
1C (regenerado)	"				21	1,5	0,02	6%	73		1,0		
2A (lavado)	25/75	354		Amberlite XAD7HP	251	0,9	0,01	71%	4		0,0		
2B (eluato)	"				88	19,5	7,35	25%	221	97%	83,3	95	2,65
2C (regenerado)	"				36	0,1	0,16	10%	3		4,6		
3A (lavado)	65/35	313	35	Amberlite XAD1180	193	0,9	0,05	69%	5		0,2		
3B (eluato)	"				66	19	6,69	24%	287	77%	101	93%	2,84
3C (regenerado)	"				18	1,5	0,13	7%	82		6,8		
4A (lavado)	65/35	349	29	Amberlite XAD7HP	195	0,4	0,01	61%	2		0,0		
4B (eluato)	"				87	21,8	6,55	25%	250	98%	75,1	86%	3,33
4C (regenerado)	"				23	0,1	0,29	7%	4		12,4		

1) Extracto en bruto obtenido con mezcla de disolvente etanol/agua

2) Cantidad de extracto disuelto en 1 ml de agua aplicado en columna

5 3) el extracto en bruto de etanol/agua 65/25 no es completamente soluble en 1 ml de agua, la parte no soluble remanente se ponderó de nuevo

4) masa del extracto como mg por gramo de materia prima (hojas de *Solanum glaucophyllum* secas)

5) VDM como 1,25-dihidroxivitamina D total determinada analíticamente

6) Qu como quercetina determinada analíticamente después de hidrólisis

10 7) VDM en ppm (µg/mg) de extracto purificado obtenido

8) Rendimiento de VDM en eluato por material aplicado a columna

9) Quercetina en mg/mg de extracto purificado obtenido

10) Rendimiento de quercetina en eluato por material aplicado a columna

11) Cociente VDM/Qu en µg de 1,25-dihidroxivitamina D por mg de quercetina determinada analíticamente

15 **Discusión:**

La purificación en Amberlite XAD-1180 y Amberlite XAD-7HP es superior a cromatografía en gel de sílice y material de Sephadex tal como se describe en la bibliografía (datos no mostrados).

La cromatografía del extracto en bruto de *Solanum glaucophyllum* en Amberlite XAD-1180 produce un producto de mayor solubilidad y de color más claro. Sin embargo, la cromatografía en Amberlite XAD-7PH produce una masa mayor y un VDM mayor, mientras que el rendimiento de quercetina fue ligeramente inferior. La pureza fue igual con ambas resinas.

- 5 El cociente VDM/Quercetina es mayor cuando la extracción se realiza con etanol/agua 65/35 que con 25/75 pero el rendimiento de masa fue inferior.

El eluato, obtenido en las condiciones aplicadas, contiene únicamente glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ y glucósidos de quercetina (tal como se evidencia por HPTLC (Figura 6, línea 4)).

En la presente condición para elución con etanol/agua 96/04 (v/v), se obtuvo un rendimiento óptimo para VDE.

- 10 Ejemplo 2B - Purificación a escala industrial

I) Proceso industrial (Ejemplo PF)

Se aplicaron 0,4 kg de un extracto en bruto (derivado del proceso EP (Ejemplo 1B I)) en una columna de Amberlite XAD-7HP de 4 l de volumen. Se obtuvieron 64 g de producto purificado con un contenido de 229 ppm de metabolito de vitamina D (VDM, determinada analíticamente como 1,25-dihidroxitamina D₃) y un 17,7% de flavonoles (determinados como quercetina después de hidrólisis ácida). El producto purificado contuvo únicamente quercetina como componente de flavonol después de hidrólisis.

- 15

Los datos obtenidos del proceso PF son los siguientes:

Proceso PF	Amberlite XAD-7HP								
		masa	VDM	Qu	producto	rendimiento de masa	factor de purificación VDM	factor de purificación Qu	Rendimiento 1)
		kg	ppm	mg/g	[m*c]	kg/kg			%
Extracto en bruto 2)	entrada	0,400	46	17	18,4	-	-	-	
Extracto 1)	salida	0,064	229	176,8	15	0,48	5,0	10,4	80%
1) rendimiento de masa después de secado									
2) se aplicó extracto en bruto como una disolución acuosa al 10% en la columna.									

II) Industrial (Ejemplo PS)

- 20 Se aplicaron 9 l de una disolución de extracto en bruto al 30% (derivada del proceso EM (Ejemplo 1B II)) en una columna de Amberlite XAD-1180 de 35 l de volumen. Se obtuvieron 575 g de producto purificado con un contenido de 322 ppm de metabolito de vitamina D (VDM, determinada analíticamente como 1,25-dihidroxitamina D₃) y un 15,9% de flavonoles (determinados como quercetina después de hidrólisis ácida). El producto purificado contuvo únicamente quercetina como componente de flavonol después de hidrólisis.

- 25 Los datos obtenidos del proceso PS son los siguientes:

Proceso PS	Amberlite XAD-1180, media de 6 experimentos								
		masa	VDM	Qu	producto	rendimiento de masa	factor de purificación VDM	factor de purificación Qu	Rendimiento 1)
		kg	ppm	mg/g	[m*c]	kg/kg			%

ES 2 702 987 T3

Proceso PS		Amberlite XAD-1180, media de 6 experimentos							
		masa	VDM	Qu	producto	rendimiento de masa	factor de purificación VDM	factor de purificación Qu	Rendimiento 1)
		kg	ppm	mg/g	[m*c]	kg/kg			%
Extracto en bruto 2)	entrada	9	29	17	261	-	-	-	
Extracto 1)	salida	0,575	322	158 9	185	0,19	11,1	9,3	71%
1) Después de secado									
2) Se aplicó una disolución de 9 l que contiene un 30% de materia seca en 35 l de resina.									

5 El extracto de planta enriquecido de la invención obtenido con la etapa de purificación I) o II) es una composición con un contenido estandarizado del metabolito de vitamina D₃ activo 1,25-dihidroxitamina D₃ en una forma ligada glucosídicamente y un contenido óptimo y uniforme del flavonol quercetina en el hueso, también presente en la forma ligada glucosídicamente.

Ejemplo 3 - Caracterización de las propiedades del extracto de planta enriquecido

I) Caracterización del extracto de planta enriquecido en general:

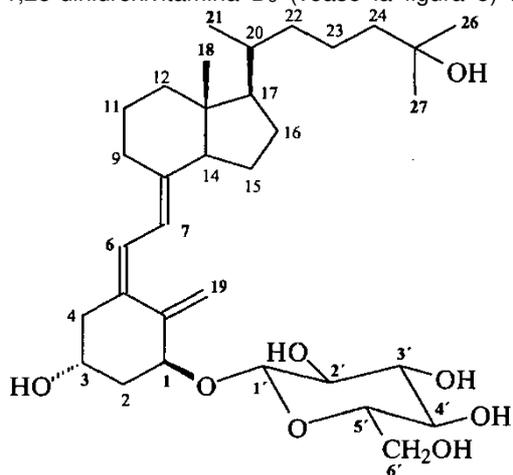
10 La preparación obtenida se analizó y se caracterizó en términos de sus componentes activos, ingredientes inactivos y la ausencia de componentes tóxicos, donde el producto se optimizó para un contenido mínimo de componentes tóxicos y un mínimo de pardeamiento/decoloración durante las etapas de producción. Particularmente, el extracto de planta enriquecido, es decir, el producto obtenido por la preparación descrita anteriormente (Ejemplos 1 y 2) se caracterizó por las siguientes propiedades:

Contenido activo como 1,25-dihidroxitamina D ₃	> 300 µg/g ¹⁾
Contenido activo como quercetina	> 150 mg/g
Contenido inactivo como carbohidratos (después de hidrólisis ácida) ²⁾	< 750 mg/g
Contenido inactivo como proteína ³⁾	< 20 mg/g
Contenido inactivo como grasa ⁴⁾	< 20 mg/g
Contenido inactivo como ácidos de planta, pigmentos y fitoesteroles	< 20 mg/g
Contenido inactivo como materia inorgánica	< 60 mg/g
Contenido inactivo como alcaloides	< 0,5 mg/g
Contenido tóxico como residuos de metales pesados y pesticidas	Según la Ph.Eur.
Tiene un cociente de vitamina D activa (expresada como 1,25-dihidroxitamina D ₃) a flavonol activo (expresado como quercetina)	1-5*10 ⁻³
> mayor a	²⁾ determinación de carbohidratos

< inferior a	reductores (bibliografía)
1) al menos 15 veces superior al contenido en material en bruto	3) precipitación en 10% de ácido tricloroacético
	4) extracción con hexano

II) Caracterización por componentes activos de vitamina D₃

La composición, es decir, el extracto de planta enriquecido de la invención preparado anteriormente, se caracterizó además por la presencia de los componentes activos de vitamina D glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D con una distribución de la masa molar de 596,8 (416,6+180,2) a 4500 Dalton (una separación cromatográfica del extracto purificado en una columna de Sephadex G25 analítica se muestra en la Figura 2). Se aplicaron partes alícuotas de la fracción a la hidrólisis y se evaluaron para 1,25-dihidroxitamina D₃. Se utilizó poliestireno soluble en agua con 1400, 4300 y 6800 Dalton como marcador de masa. Una separación cromatográfica del extracto purificado en una columna de Superdex-30 analítica se muestra en la Figura 3. Se aplicaron partes alícuotas de la fracción a la hidrólisis y se evaluaron para 1,25-dihidroxitamina D₃. Se utilizó cobalamina con una masa molecular de 1355 Dalton como marcador de masa. Además, la composición se caracterizó por la presencia de 1β-glucopiranosido de 1,25-dihidroxitamina D₃ (véase la figura 5) tal como revelaron los espectros LC-MS, UV, ¹H-NMR y ¹³C-NMR



Una característica adicional del extracto de planta enriquecido de la invención es la ausencia de 1,25-dihidroxitamina D₃ libre y 25-hidroxitamina D₃

Los datos analíticos del compuesto principal 1β-glucopiranosido de 1,25-dihidroxitamina D₃ son los siguientes: Espectro LC-MS (POS, TIEMPO= 7,787:8,041):

m/z = 543 [M+H - 2 H₂O]⁺, 399[M + H - Glu]⁺, 381 [M + H - H₂O - Glu]⁺, 363 [M+H - 2 H₂O - Glu]⁺,

(véase; CTL: m/z = 399 [M+H - H₂O]⁺, 381 [M + H - 2 H₂O]⁺, 363[M + H - 3 H₂O]⁺,

(CTL = calcitriol);

Masa molecular (ESI-TOF):

C ₃₃ H ₅₄ O ₈ m/z [M+Na ⁺]:	calc. 601,3736	
	encontrada: 601,3711	Diferencia: 4,2ppm
C ₆₆ H ₁₀₈ O ₁₆ m/z [M+Na ⁺]:	calc. 1179,7530	
	encontrada: 1179,7520	Diferencia: -0,8 ppm

Espectro UV:

Los espectros UV mostraron dos máximos que solo se observan en compuestos CTL con grupo en la posición C1-O. UV [MeOH/H₂O (9:1)]: $\lambda_{\text{máx}} = 244,71$.

Espectro ¹H-NMR (400 MHz. CDCl₃, 40°C):

5 δ [ppm] = 0,55 (s, 3H, 18), 0,94 (d, ³J(21,20) = 6,4 Hz, 3H, 21), 1,22 (s, 6H, 26/27), 3,30 (dd, ³J(2', 3') = 9,2 Hz, ³J(2', 1') = 7,6 Hz, 1H, 2'), 3,38 (m, 1H, 5'), 3,48 (dd, ³J(4', 3') = 9,2 Hz, ³J(4', 5') = 8,8 Hz, 1H, 4' o 3'), 3,59 (dd, ³J(3', 2') = 9,2 Hz; ³J(3', 4') = 9,2 Hz; 1H, 3' o 4'), 3,83 (dd, ²J(6b', 6a') = 12,0 Hz, ³J(6b', 5') = 4,8 Hz, 1H, 6b'), 3,93 (dd, ²J(6a', 6b') = 11,6 Hz, ³J(6a', 5') = 3,6 Hz, 1H, 6a'), 4,17 (m, ³J(3 α , 4 β) = 5,6 Hz, ³J(3 α , 4 α) = 3,6 Hz, 1H, 3 α), 4,36 (d, ³J(1', 2') = 7,6 Hz, 1H, 1'), 4,45 (t, ³J(1 β , 2) = 4,0 Hz, 1H, 1 β), 5,15 (d, ²J(19E, 19Z) = 2,0 Hz, 1H, 19E), 5,30 (d, ²J(19Z, 19E) = 1,6 Hz, 1H, 19Z), 5,98 (d, ³J(7, 6) = 11,6 Hz, 1H, 7), 6,40 (d, ³J(6, 7) = 11,2 Hz, 1H, 6).

10 Espectro ¹³C-NMR (CDCl₃):

δ [ppm]=12,1 (18), 18,8 (21), 29,2 (26/27), 62,5 (6'), 99,1 (1 β), 117,1 (19E), 117,1 (19Z).

Así, la presencia de 1 β -glucopiranosido de 1,25-dihidroxivitamina D₃ se identificó inequívocamente.

III) Caracterización de flavonoles vegetales

15 La composición, es decir, el extracto de planta enriquecido de la invención preparado anteriormente, se caracteriza adicionalmente por la presencia de solo un flavonoide bioactivo, el flavonol quercetina en forma glucosídica. La composición de los glucósidos de quercetina se da en la Tabla 2 y se caracteriza como huella después de cromatografía de capa fina de alto rendimiento según la Figura 6. Se llevó a cabo caracterización cromatográfica de capa fina de alto rendimiento utilizando la preparación obtenida y una comparación con estándares y con un ginkgo y un extracto de espino (véase el Ejemplo 3 (III)). Las condiciones son las siguientes:

placas:	gel de sílice G con indicador UV 10x10cm Merck (Camag AG, Muttenz Suiza)	
Disolvente:	acetato de etilo/ácido fórmico/ácido acético/agua (100+11+11+26). preacondicionamiento de 45 minutos, duración del ensayo 45 minutos;	
Detección:	reactivo Naturstoff (Camag AG, Muttenz Suiza)	
Aplicación:	Línea 1	quercetina (rf 0,88; 0,56 μ g); hiperósido (rf 0,55; 1,25 μ g); ácido clorogénico (rf 0,42; 1,2 μ g); rutina (rf 0,37; 0,73 μ g) (la línea contiene estándar de referencia de Fluka AG, Buchs Suiza)
	Línea 2	kaempferol (rf 0,90; 0,25 μ g); isoquercitrina (rf 0,57; 1,25 μ g); hiperósido (rf 0,54; 1,25 μ g); (la línea contiene estándar de referencia de Fluka AG, Buchs Suiza)
	Línea 3	ácido cafeico (rf 0,82; 0,1 μ g); isoquercitrina (rf 0,57; 0,125 μ g); (la línea contiene estándar de referencia de Fluka AG, Buchs Suiza)
	Línea 4	extracto purificado (Tanda 1; 41 μ g), se aplicaron 41 μ g de extracto de planta enriquecido purificado de la presente invención. Se pueden separar quercetina, glucósidos de quercetina y extractos de planta secundarios ubicuos, incluidos ácido cafeico y ácido clorogénico (véase la Figura 6).
	Línea 5	extracto purificado (Tanda 2; 41 μ g), se aplicaron 41 μ g de extracto de planta enriquecido purificado de la presente invención. Se pueden separar quercetina, glucósidos de quercetina y extractos de planta secundarios ubicuos, incluidos ácido cafeico y ácido clorogénico (véase la Figura 6). Las líneas 4 y 5 muestran una ligera diferencia entre tanda y tanda.
	Línea 6	extracto de ginkgo biloba (producto comercial, 10 μ l) (extracto de ginkgo biloba comercial (Ceres AG, Suiza));
	Línea 7	extracto de espino (producto comercial, 201 μ g) (extracto de espino comercial (Zeller AG, Romanshorn, Suiza). Ambos extractos de la líneas 6 y 7 son de una composición diferente);
	Línea 8	Estándares idénticos a la línea 1 (Fluka AG, Buchs Suiza);

	Línea 9	extracto comparativo purificado según la técnica (cromatografía en Sephadex G-10) (muestra comparativa de un extracto purificado en una columna Sephadex G10). A pesar de la alta tasa de enriquecimiento de la actividad de la vitamina D (2000 µg/g), virtualmente, no hay flavonoles presentes.
--	---------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

El análisis de la caracterización cromatográfica de capa fina de alto rendimiento llevó a los siguientes resultados (véase la Tabla 2):

Tabla 2: Contenido de flavonol del extracto de planta enriquecido de la invención

Glucósidos de quercetina	mg/g
Apiosil rutina	50 - 100
Rutina	120 - 200
Otros oligosacáridos de quercetina	5 - 50
Hiperósido	5 - 20
Otros monoglucósidos de quercetina	10 - 50
Quercetina	2 - 50
Kaempherol	< 20

5

Debe mencionarse que la purificación por cromatografía en resinas de Sephadex produce un producto de alto contenido de 1,25-dihidroxivitamina D₃, sin embargo, por la ausencia virtual de flavonoles como se vio en la línea 9 de la Figura 5.

Ejemplo 3 - Experimentos que prueban la acción biológica del extracto de planta enriquecido de la invención

10 I) Evaluación de la actividad de vitamina D por medio de un bioensayo en codornices japonesas (Experimento 1)

De Rambeck *et al.* (véase Rambeck *et al.*, Ann. Nutr. Metab. 30, 9-14, (1986)) se conoce que el ensayo de cáscara de huevo de codorniz se utiliza como un bioensayo simple para evaluar la actividad de vitamina D. Según este ensayo, las codornices japonesas (*Coturnix japonica*) en edad de poner huevos y seleccionadas para un rendimiento de puesta de >80% se establecieron en una dieta deficiente en vitamina D que contiene todos los otros nutrientes en cantidades óptimas. Después de aproximadamente 8 días, el rendimiento de puesta como el marcador más sensible bajó por debajo de un 10%. Entonces, los animales de prueba se dividieron aleatoriamente en grupos de 10 animales y se cambió la dieta a la misma dieta, pero suplementada con la sustancia que se iba a probar. El rendimiento de puesta se controló durante 21 días junto con otros marcadores del metabolismo de la vitamina D, tales como fosfatasa alcalina y calcio en plasma.

20 En el Experimento 1, tres grupos de codornices recibieron 100, 200 y 400 unidades internacionales de vitamina D₃ por kg de alimento, 5 grupos recibieron 2, 8, 32, 128 y 514 mg / kg de extracto vegetal purificado y a un grupo se le dio 1,25-dihidroxivitamina D₃ sintética (1 µg / kg de alimento) y otro grupo recibió hojas secas molidas de *Solanum glaucophyllum* (1000 mg / kg de alimento).

25 Tabla 3: Peso de la cáscara de huevo (ESW) en g por día y animal como parámetro para la actividad de la vitamina D en el bioensayo de codorniz japonesa

Sustancia de prueba y dosis dada	dosis	Unidades por kg de alimento	ESW [g] días 5 - 21	±SD %
Vitamina D ₃	100	IUD	0,231	0,133
Vitamina D ₃	200	"	0,434	0,183

Sustancia de prueba y dosis dada	dosis	Unidades por kg de alimento	ESW [g] días 5 - 21	±SD %
Vitamina D ₃	400	"	0,738	0,169
Extracto purificado	2	mg	0,017	0,029
Extracto purificado	8	"	0,187	0,164
Extracto purificado	32	"	0,687	0,152
Extracto purificado	128	"	0,802	0,071
Extracto purificado	512	"	0,782	0,176
1,25(OH) ₂ D ₃ sintética	1	µg	0,502	0,170
Hojas de <i>Solanum glaucophyllum</i>	1000	mg	0,361	0,156

5 La evaluación por análisis de probit de los pesos de la cáscara de huevo mostró una actividad de vitamina D₃ del extracto purificado de aproximadamente 10,000 IUD/g, mientras que, en las hojas de *Solanum glaucophyllum*, se encontró una actividad de vitamina D₃ de aproximadamente 200 IUD/g (1 Unidad Internacional (IU) de vitamina D (IUD) es el equivalente biológico de 0,025 µg de colecalciferol/ergocalciferol). Por lo tanto, la composición obtenida tiene una actividad de vitamina D 50 veces mayor a la del material en bruto básico.

10 En adición a la determinación de la actividad de la vitamina D, el experimento reveló una buena aceptación del extracto purificado en un amplio intervalo de dosificación. Para la 1,25-dihidroxitamina D₃ sintética, se encontró un margen terapéutico de 2 a 5 en pollos (véase Rambeck *et al.*, supra), mientras que el extracto purificado se toleró bien en un intervalo de dosificación de 32 mg/kg de alimento (comienzo del efecto) hasta 512 mg/kg de alimento sin mostrar un descenso del rendimiento de puesta de huevos (ESW en la Tabla 3).

15 Además, el inicio de la puesta de huevos después del comienzo del tratamiento con el extracto purificado de *Solanum glaucophyllum* fue más rápido que con vitamina D₃ tal como se puede estimar por el periodo de tiempo en el que el rendimiento de puesta pasó del 50%. Por medio de tratamiento con extracto purificado, el periodo de tiempo es de 24-48 horas, mientras que por medio de tratamiento con vitamina D₃ es 48-72 horas.

Un hallazgo adicional es el aumento significativo del peso de los huevos en los grupos a los que se les dio el extracto purificado en comparación con el grupo estándar que recibió 400 IUD/kg de alimento tal como se muestra en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4: El peso medio del huevo recogido entre los días 1 y 21 en el ensayo con codornices japonesas

Sustancia de prueba y dosis dada	Peso del huevo g	SD* g	%	P**
Vitamina D ₃ 100 IUD/kg de alimento	9,61	0,74	90%	
Vitamina D ₃ 200 IUD/kg de alimento	10,40	0,60	97%	ns***
Vitamina D ₃ 400 IUD/kg de alimento	10,70	0,71	1,00	-
Extracto purificado 32 mg/kg de alimento	11,23	0,77	105%	0,034
Extracto purificado 128 mg/kg de alimento	11,27	0,67	105%	0,007
Extracto purificado 512 mg/kg de alimento	11,39	0,81	106%	0,007
1,25(OH) ₂ D ₃ sintética				ns***

Sustancia de prueba y dosis dada	Peso del huevo g	SD* g	%	P**
1,0 µg/kg de alimento	10,58	0,80	99%	
Hojas de <i>Solanum glaucophyllum</i>				ns***
1000 mg/kg de alimento	10,50	0,56	98%	
* desviación estándar				
** significación obtenida por análisis de varianza de una sola vía				
*** no significativo				

II) Experimento con pollos de engorde para anomalías en las patas (Experimento 2)

5 En el experimento 2, pollos de engorde macho de un día de edad se alimentaron con una dieta comercial que contenía 1,000 IUD/kg de alimento de vitamina D₃ a voluntad. Un grupo de control recibió una dieta no suplementada, mientras en otros dos grupos la dieta se suplementó con 32 mg/kg y, respectivamente, 128 mg/kg del extracto purificado correspondiente a 4,3 resp. 76.8 µg de 1,25-dihidroxitamina D₃ (determinado después de hidrólisis *in vitro* del extracto). La Tabla 5 muestra la reducción de discondroplasia tibial (DT) y otras anomalías en las patas en pollos de engorde comerciales después de tratamiento con el extracto de planta enriquecido purificado de la invención de *Solanum glaucophyllum*.

10 Tabla 5: Tratamiento de discondroplasia tibial (DT) y otras anomalías en las patas en pollos de engorde comerciales después del día 14 de tratamiento

Sustancia de prueba y dosis dada	Aparición de DT (%)	Aparición de otras anomalías en las patas (%)	Animales sanos (%)
Grupo de control	30,8 a	26,9 a	42,3 a
Extracto purificado 16 mg/kg	6,9 *b	0 b	93,1 b
Extracto purificado 64 mg/kg	0 *b	3,2 b	92,9 b
1,25-Dihidroxitamina D ₃ 5 µg/kg (control positivo)	3,55 *b	3,55 b	92,9 b
* significación de tratamiento frente a b p < 0,05			

III) Actividad en prevención de un descenso en calcio en sangre durante el parto (Experimento 3)

15 La fiebre de la leche es una enfermedad metabólica en animales productores de leche relacionada con la parición, cuando reconstituir la producción de leche agota el calcio circulante en la sangre de la madre. La homeostasis del calcio endógeno no es capaz de movilizar suficiente calcio del alimento o hueso para prevenir una disminución del calcio en sangre. En ciertos casos, la concentración baja de calcio induce paresia muscular. El tratamiento actual consiste en aplicar grandes dosis de calcio alrededor del parto (véase The Merck Veterinary Manual, Parturient Paresis in Cows).

20 En el experimento, se distribuyeron aleatoriamente vacas preñadas a dos regímenes de tratamiento. Un grupo recibió un producto comercial que contenía 42 g de sales de calcio por aplicación en bolo. Se dieron cuatro bolos alrededor del parto según la recomendación del fabricante. El producto de la presente invención se dio en una dosis única de 5 g entre 72 a 24 horas antes del parto. No se incluyó un grupo sin tratamiento por cuestiones éticas, una disminución peripartal en calcio en plasma está bien documentada (véase la Figura 7, Goff JP, Horst RL. J Dairy Sci. 1997 Jan;80(1):176-86. Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to prepartum rations on milk fever in dairy cows.).

Como resultado, una única dosis de la composición de la invención fue capaz de prevenir un descenso en calcio en plasma en la misma manera como cuatro aplicaciones de 43 g de calcio alrededor del parto tal como se ve en la Figura 7.

IV) Actividad en un modelo animal para osteoporosis humana (Experimento 4)

5 La actividad del extracto de planta enriquecido de la invención, que contenía ambos principios activos, 1,25-dihidroxitamina D₃ (como 1β-glucopiranosido de 1,25-dihidroxitamina D₃) y la quercetina flavonoide, en una matriz natural se ha probado en un modelo de rata inducido por ovariectomía para osteoporosis menopáusica humana, un modelo preclínico para osteoporosis en ratas.

10 Se obtuvieron ratas hembra ovariectomizadas y compañeros de camada operados de forma simulada de 120 g de peso (de Charles River Labs, L'Arbresle, Francia), y se separaron en grupos. Después de aclimatación, se alimentaron con una dieta de control (grupos simulados y ovariectomizados) o la misma dieta que contiene los productos de prueba (sol y alendronato). El alendronato se probó como control positivo para validar el experimento. El alendronato se introdujo en terapia antiosteoporosis humana. Durante el experimento, se recogió la sangre y orina y se evaluaron los marcadores de recambio óseo y formación. Después de 6 meses, se terminó el experimento y se midieron la ceniza de huesos y tomografía de rayos X.

15 Un experimento *in vitro* para demostrar la actividad del componente de quercetina de la presente composición se hizo en un cultivo de célula ósea con libre de quercetina y libre de 1,25-dihidroxitamina D₃ como controles positivos.

20 Como resultado global, se encontró un fuerte efecto inesperado para la composición de planta enriquecida de la invención, que se puede explicar por una acción sinérgica de los dos principios activos, 1,25-dihidroxitamina D₃ y quercetina. Así, el tratamiento con la composición de la invención no solo evitó pérdida ósea inducida por ovariectomía, sino que la composición aumentó la masa ósea en la tibia en comparación con los controles operados de forma simulada en la Figura 9.

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar y purificar un extracto de planta a partir de la especie *Solanum glaucophyllum* que comprende como componentes metabolitos de vitamina D₃ presentes como glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ en una concentración de al menos 300 µg/g determinados analíticamente como 1,25-dihidroxitamina D₃ total y glucósidos de quercetina en una concentración de al menos 100 mg/g determinados como quercetina después de hidrólisis ácida, donde el método comprende las siguientes etapas:
- 5 a) extraer hojas a partir de la especie *Solanum glaucophyllum* utilizando un disolvente de mezcla de etanol/agua que tiene una relación (%) de etanol/agua de 80/20 a 50/50 o tiene una relación (%) de etanol/agua de 35/65 a 20/80 (v/v); y
- 10 b) purificar el extracto obtenido según la etapa a), utilizando las etapas:
- b1) aplicar el extracto de planta obtenido según la etapa a) a una columna que comprende una resina polimérica no iónica, seleccionada de entre poliestireno, copolímeros de etireno divinilbenceno, polímeros de éter acrílico, y resinas polifenólicas;
- b2) lavar la columna con agua;
- 15 b3) eluir el extracto de planta de la columna; y
- b4) concentrar y/o secar el extracto.
2. Método según la reivindicación 1, donde la etapa a) comprende la etapa de molido, percolación y/o maceración de hojas secas a partir de la especie *Solanum glaucophyllum*.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, donde la mezcla de etanol/agua tiene una relación (%) de etanol/agua de 25/75 o de 75/25 (v/v) por extracciones de tipo percolación o de 65/35 de etanol/agua (v/v) para extracciones de tipo maceración.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la relación (%) del disolvente de mezcla/fármaco es de 9 (v/p) para extracciones de tipo percolación o de 5 (v/p) para extracciones de tipo maceración.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la etapa a) se lleva a cabo en un intervalo de temperatura de 40°C a 60°C y donde la mezcla de disolvente en la etapa a) se ajusta a un valor de pH de 5,5 a 6,5.
- 25 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el extracto obtenido según la etapa a) y/o b) se concentra o seca hasta un contenido de un 25-35% de materia no volátil.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el extracto obtenido según la etapa a) se somete a tratamiento térmico comprendido entre un mínimo de 100°C durante 30 a 40 segundos y un máximo de 145°C durante 2 a 10 segundos.
- 30 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la resina polimérica no iónica se selecciona entre resinas de Amberlite XAD incluidas Amberlite XAD-1, XAD-2, XAD-4, XAD-5, XAD-7, XAD-7HP, XAD-8 o XAD-1180.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el extracto obtenido según la etapa a) y/o b) se seca por atomización, se seca por banda o se liofiliza.
- 35 10. Extracto de planta a partir de *Solanum glaucophyllum* obtenido u obtenible por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende como componentes:
- metabolitos de vitamina D₃ presentes como glucósidos de 1,25-dihidroxitamina D₃ en una concentración de al menos 300 µg/g determinados analíticamente como 1,25-dihidroxitamina D₃ total; y
- 40 glucósidos de quercetina en una concentración de al menos 100 mg/g determinados como quercetina después de hidrólisis ácida.
11. Extracto de planta según la reivindicación 10, que se caracteriza adicionalmente por un contenido de alcaloides por debajo de 10 µg/g.
- 45

Osteoporosis, profilaxis y tratamiento

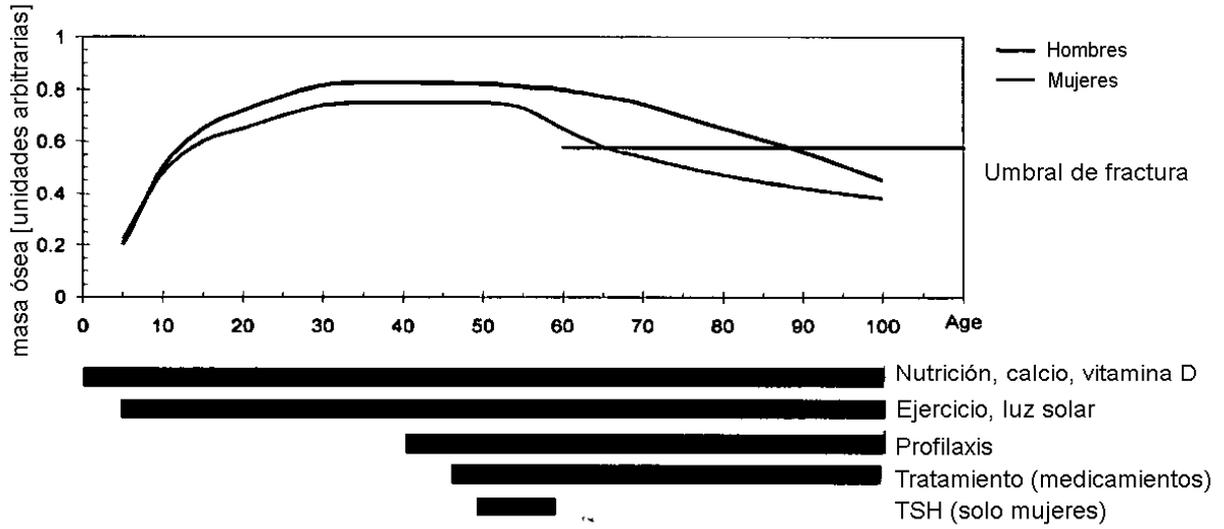


Figura 1

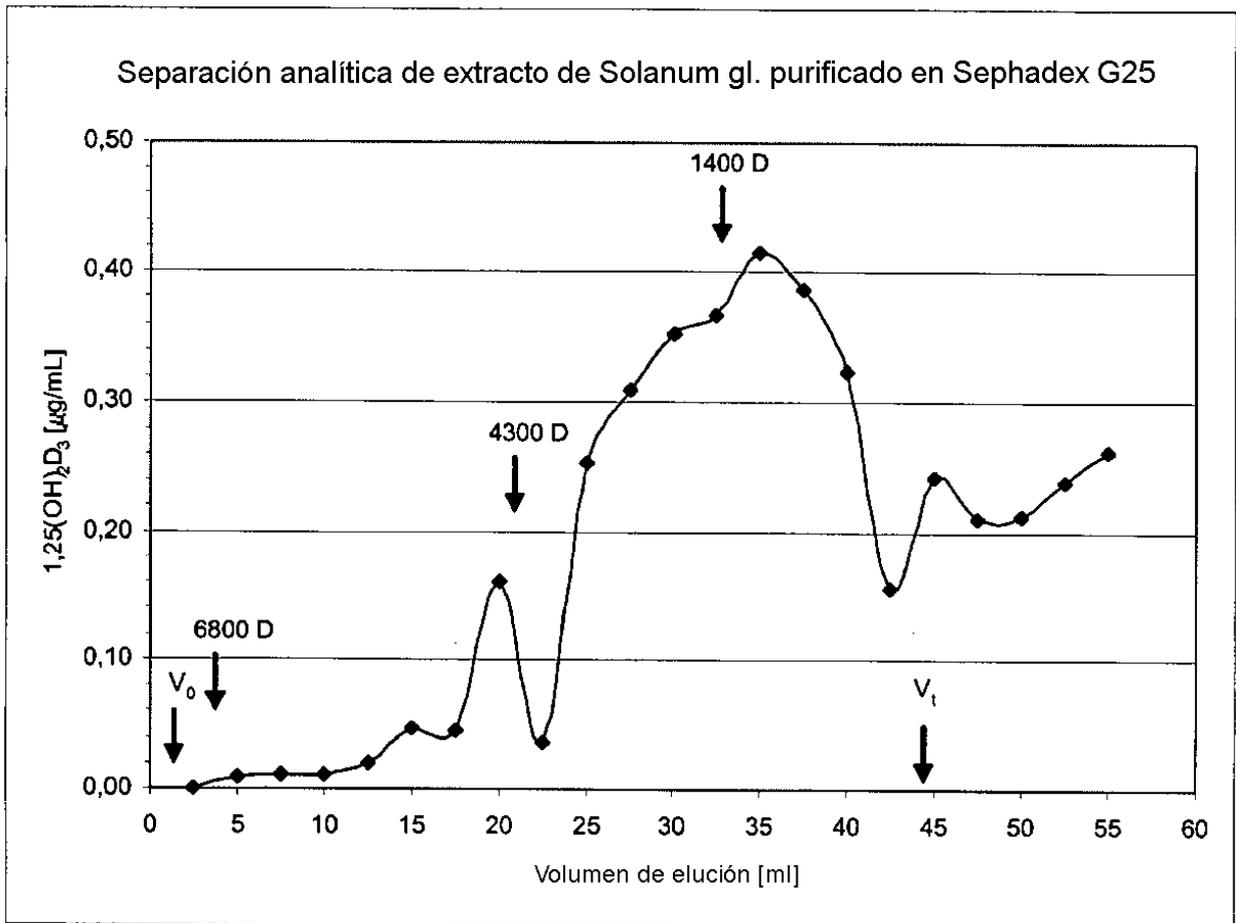


Figura 2

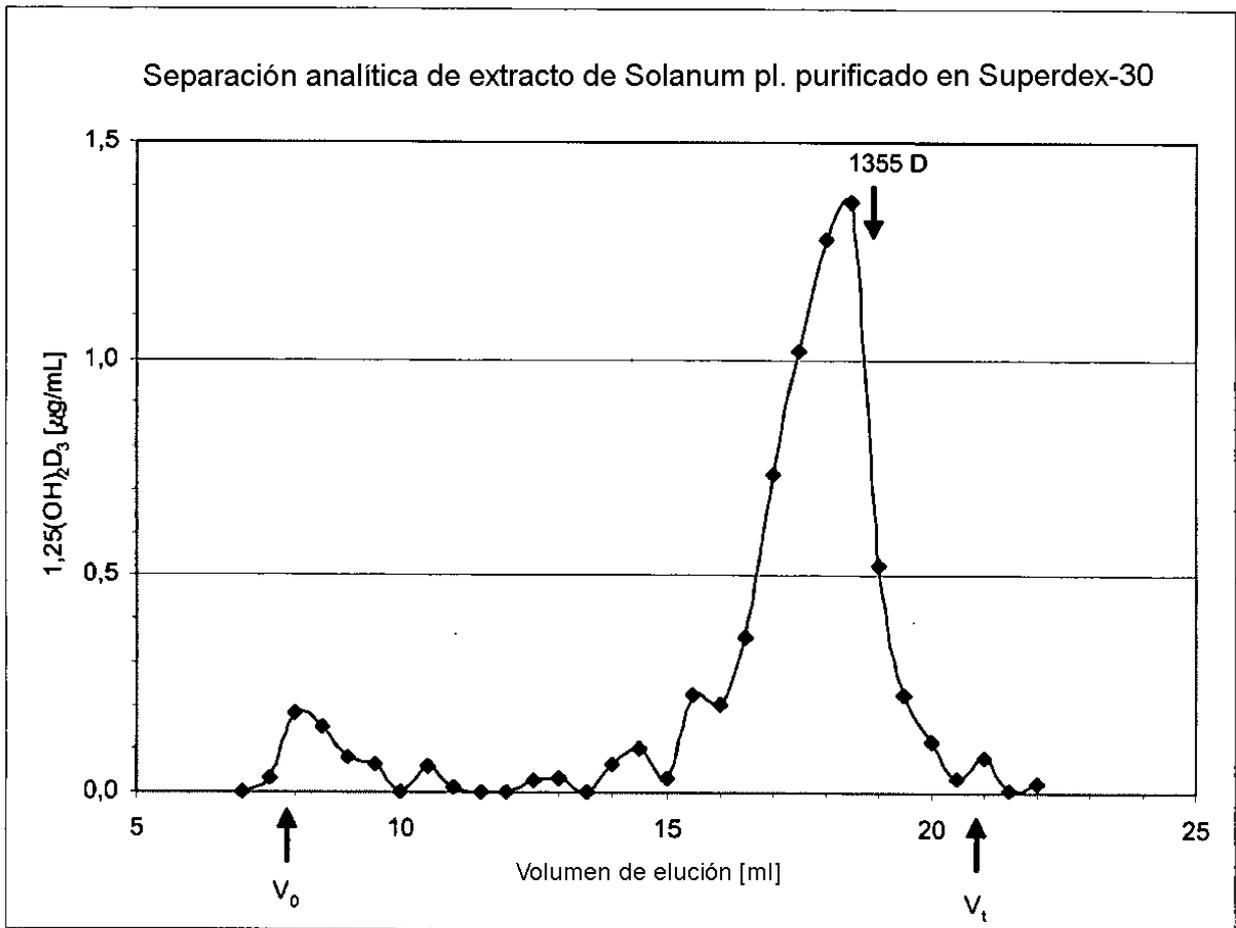


Figura 3

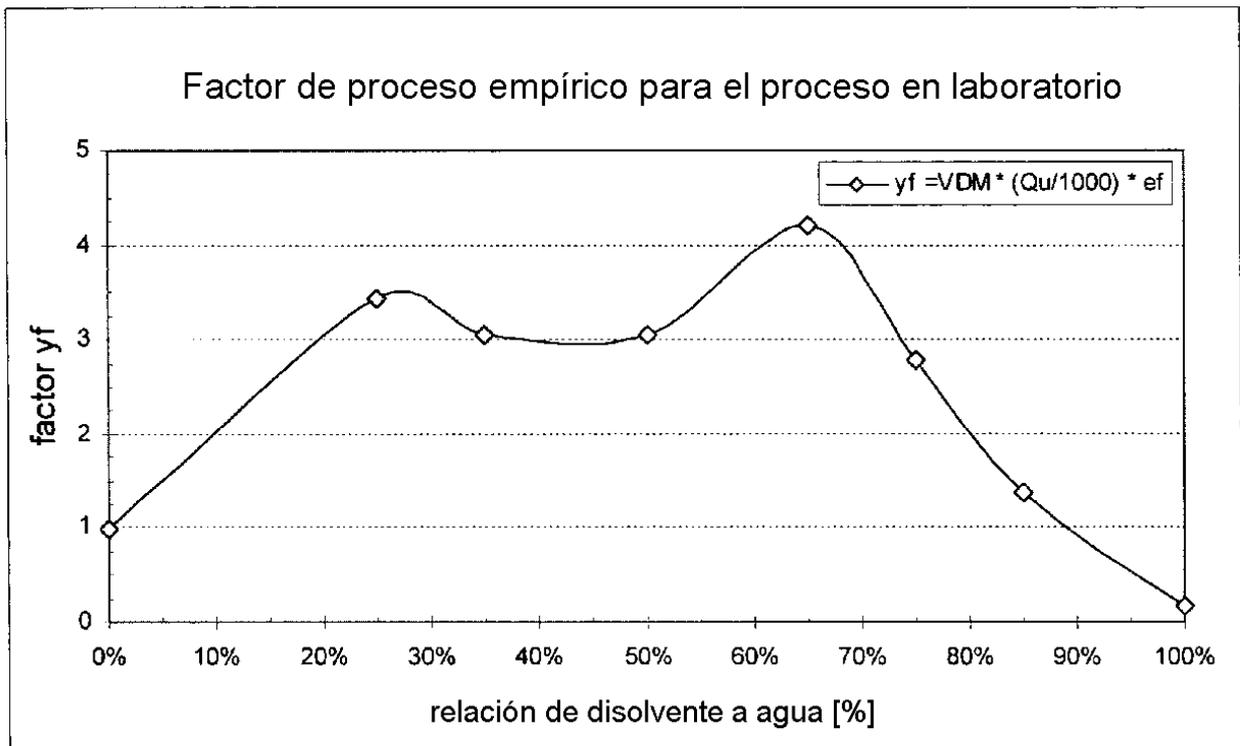


Figura 4

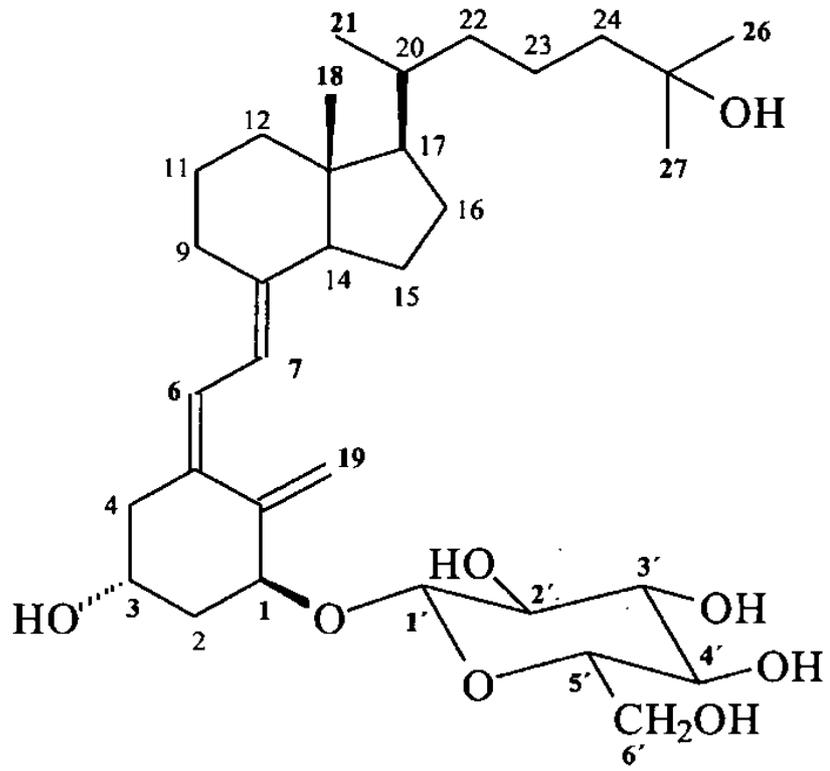


Figura 5

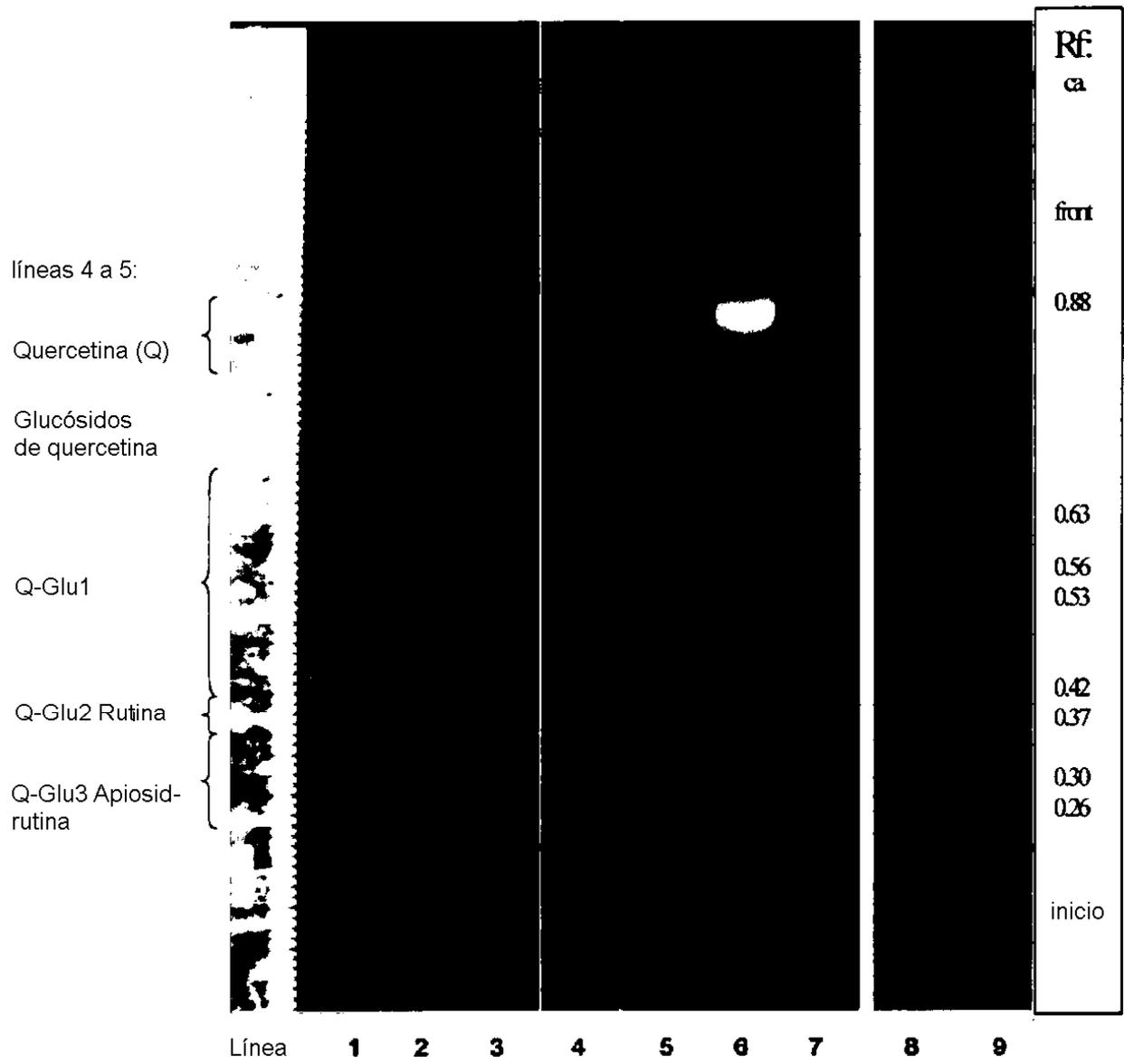


Figura 6

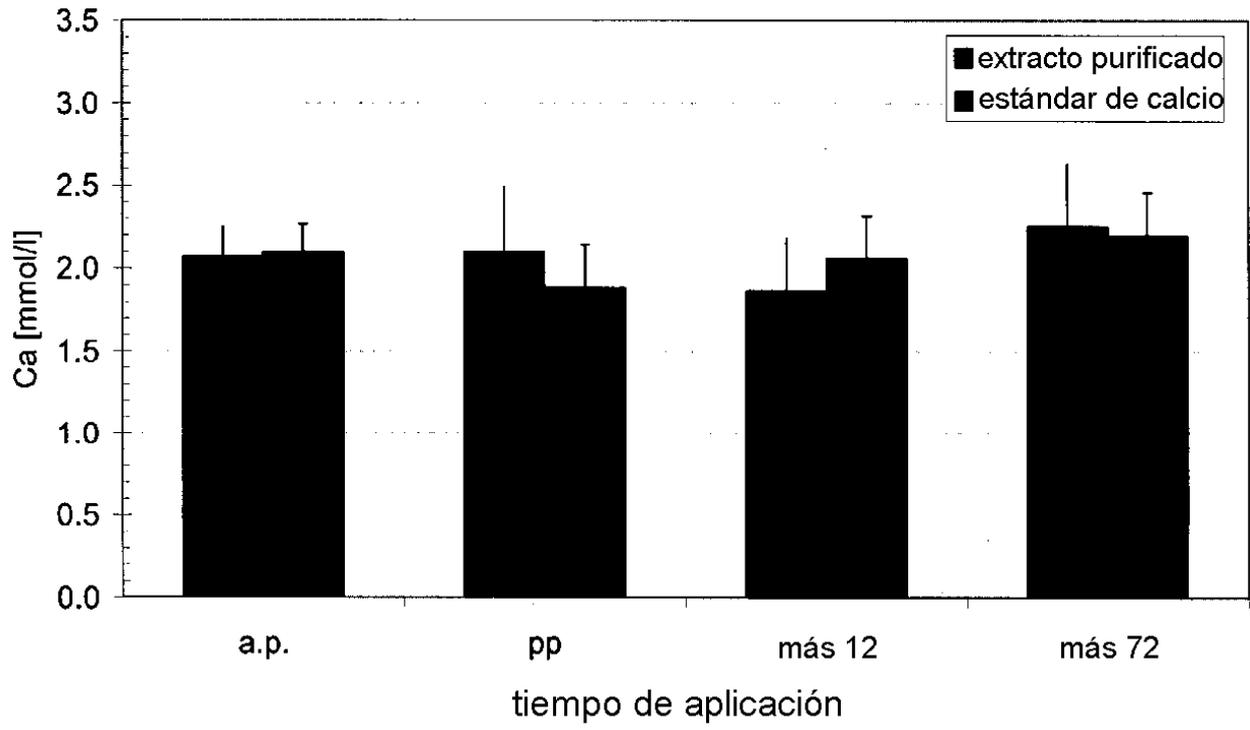


Figura 7

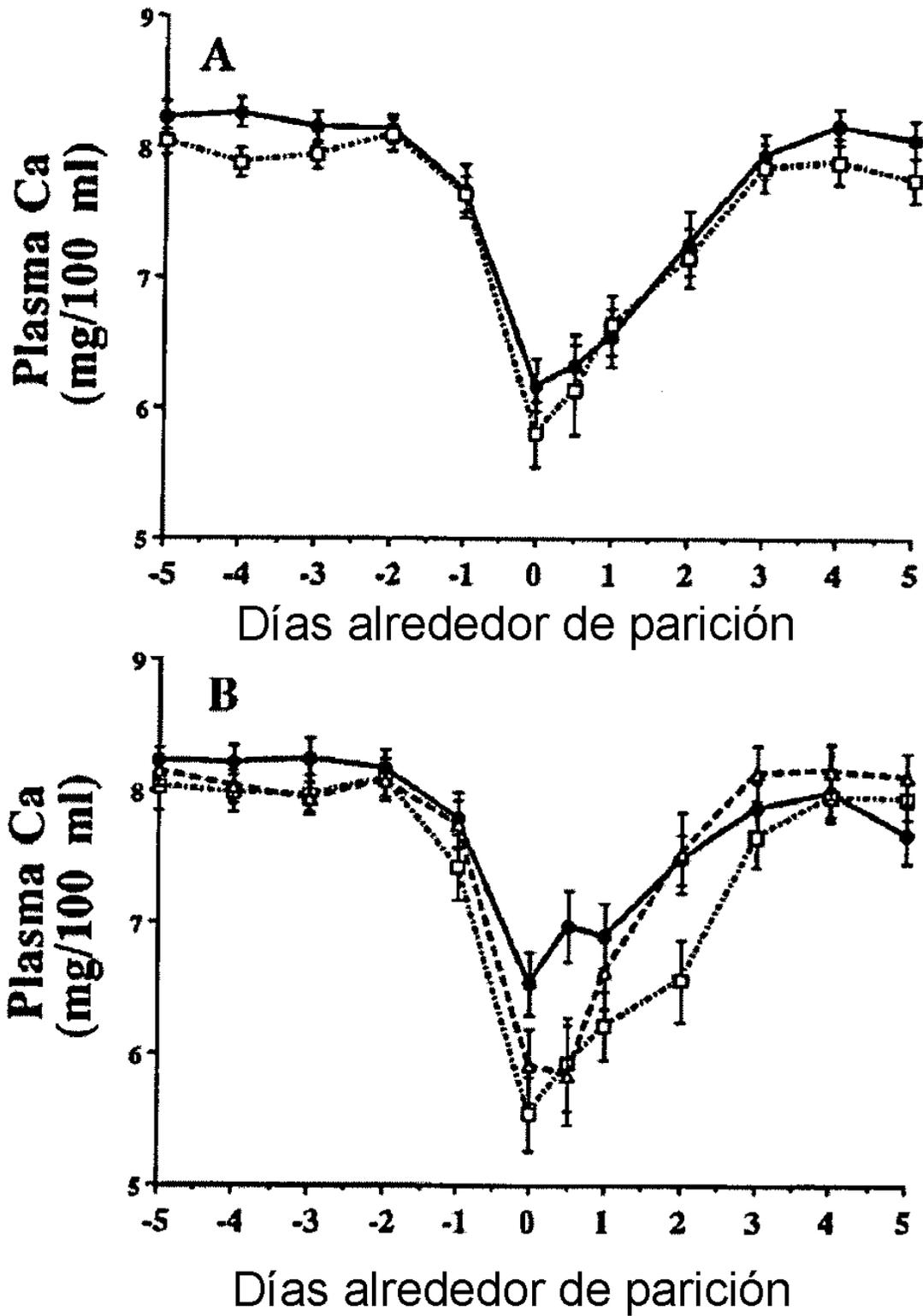


Figura 8

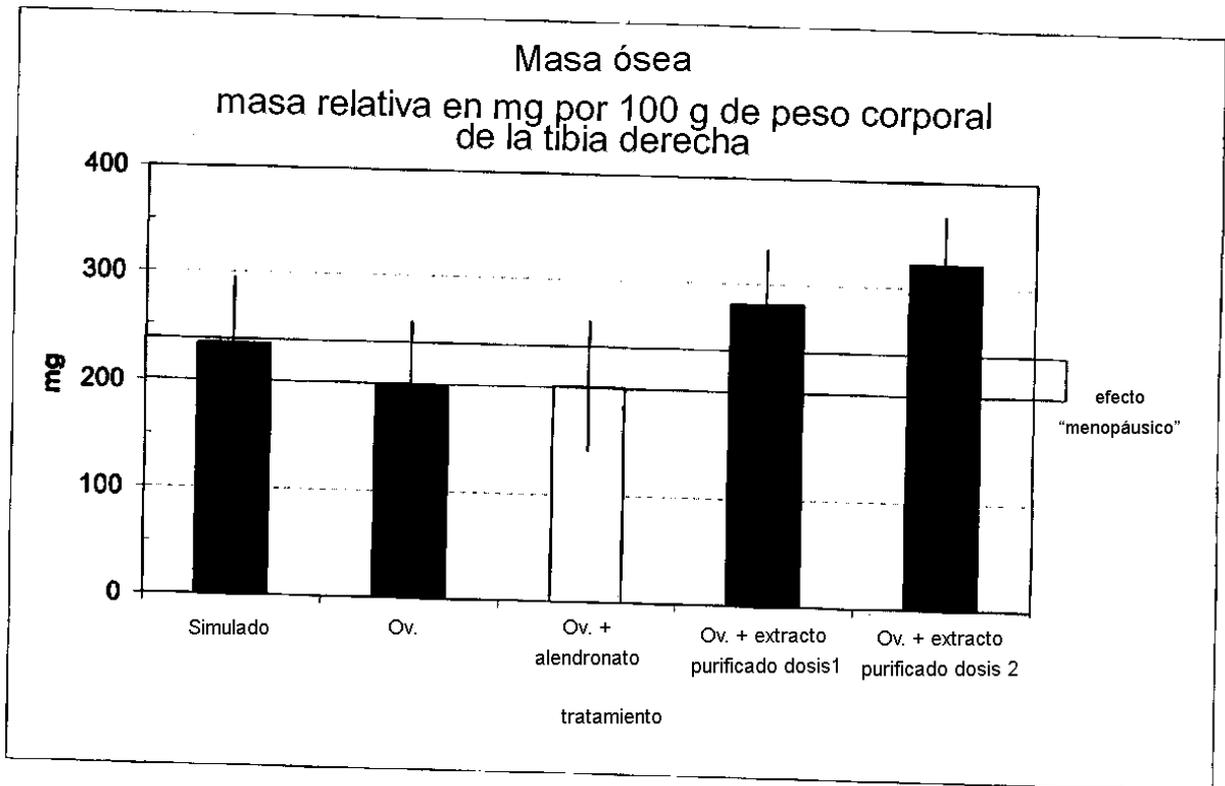


Figura 9