

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 351**

51 Int. Cl.:

A61K 36/71 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2014 PCT/KR2014/003742**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15002378**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2014 E 14819974 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3031465**

54 Título: **Composición farmacéutica para promover la formación de tejido óseo, que contiene el extracto de hoja de Stauntonia hexaphylla como ingrediente activo**

30 Prioridad:

30.06.2013 KR 20130076190

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

17.06.2020

73 Titular/es:

**JEONNAM BIOINDUSTRY FOUNDATION (50.0%)
30-5, Dongsunonggongdanji-gil, Naju-si
Jeollanam-do 520-330, KR y
YUNGJIN PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHOI, CHUL YUNG;
PAN, SANG O;
SEOL, HEE JIN;
LEE, GYU OK;
JANG, WOOK JIN;
KIM, HEE SOOK;
KIM, JAE YONG;
KANG, HU WON;
LEE, DONG WOOK;
KIM, SUN OH;
KIM, JAE GAP y
PARK, JOON YUNG**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 767 351 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

Composición farmacéutica para promover la formación de tejido óseo, que contiene el extracto de hoja de Stauntonia hexaphylla como ingrediente activo

Campo técnico

- 5 La presente invención se relaciona con una composición farmacéutica para promover la formación de tejido óseo. Más particularmente, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica para promover la formación de tejido óseo, la composición farmacéutica se usa para suprimir y tratar de forma segura el daño al tejido óseo y cartilaginoso sin toxicidad y efectos secundarios usando un ingrediente natural que incluye extracto de Stauntonia hexaphylla.
- 10 Antecedentes de la técnica
- En general, el tejido óseo se compone principalmente de tejido óseo denso que forma superficies óseas sólidas, y los tejidos óseos de sus partes centrales y ambos extremos de los huesos largos se componen de tejido óseo esponjoso ensamblado como mallas. La mayoría de los huesos se derivan primero del cartílago como tejido conectivo y luego se convierten en tejidos óseos. Algunos huesos de allí se forman directamente a partir de tejidos conectivos.
- 15 Hay superficies articulares en partes que contactan la epífisis de los huesos vecinos. Las superficies están cubiertas con cartílagos articulares como cartílagos hialinos. La trabécula del spongiosum presente en medio de la esponjosidad tiene arreglos constantes. Las cavidades medulares anchas de las partes disfisarias están conectadas a lagunas compuestas de trabéculas esponjosas y todas ellas están llenas de médula ósea.
- 20 La médula ósea que realiza la hematopoyesis es rojiza debido a los vasos sanguíneos presentes en esta y, por lo tanto, también se llama médula ósea roja. Todas las sustancias óseas compactas o las sustancias óseas esponjosas de los tejidos óseos están compuestas de placas óseas apiladas con un espesor de 5 a 12 μm . En sustancias óseas compactas, las placas de capa ósea (placas de capa de Havers) apiladas en forma de círculo concéntrico están dispuestas en varias direcciones, y hay un canal de Havers en el centro de cada placa. Los vasos sanguíneos pasan a través del canal de Havers.
- 25 Las células óseas están dispuestas entre las placas de la capa ósea, y las protuberancias citoplasmáticas delgadas con formas irregulares están conectadas a otras células óseas. El periostio con características resistentes de tejido conectivo está presente en las superficies de los huesos, y los nervios y los vasos sanguíneos distribuidos en estos, protegiendo así los huesos y proporcionando nutrientes. Cuando el periostio es deficiente, la supervivencia, la neogénesis y la regeneración de los huesos se ven negativamente afectadas. Los tejidos óseos incluyen 20 % de agua, 35 % de sustancias orgánicas, incluidas las células y 45 % de sustancias inorgánicas, y las sustancias orgánicas proporcionan elasticidad constante en los huesos. De acuerdo con la edad, aumentan las sustancias inorgánicas (principalmente, fosfato de calcio), lo que aumenta la dureza de los huesos.
- 30 Mientras tanto, Stauntonia hexaphylla es una planta que pertenece a plantae, magnoliophyta, anthophyta y ranales. Stauntonia hexaphylla se distribuye principalmente en Corea, Japón, Taiwán, China, etc. Los tallos principales de esta se extienden a aproximadamente 5 m y sus hojas son hojas compuestas que se cruzan y tienen forma de palma compuesta de cinco hojas pequeñas. Las hojas pequeñas son gruesas y tienen formas de huevo u ovaladas, y sus bordes son planos. Los peciolo son de 6 a 8 cm y los peciolo pequeños son de 3 cm. Sus flores florecen en mayo y son racimos monoicos, de color blanco amarillento.
- 35 Los tallos de las flores femeninas se vuelven de color marrón rojizo en el otoño y son duros debido a muchas lenticelas. Las frutas son bayas ovoides u ovales, y tienen una longitud de 5 a 10 cm. Las frutas cambian de color marrón rojizo en octubre y son más deliciosas que las frutas de vid de chocolate. Las semillas son negras y tienen formas ovoides u ovaladas.
- 40 En la presente invención, para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir la periodontitis u osteoporosis usando extracto de hoja de Stauntonia hexaphylla como material natural, se realizan experimentos de promoción de la actividad de ALP de osteoblastos y de diferenciación de osteoblastos y experimentos de promoción de generación de tejido óseo o cartilaginoso usando extracto en agua caliente de hoja de Stauntonia hexaphylla o fracciones en acetato de etilo extraídas de extracto en agua caliente de hoja de Stauntonia hexaphylla.
- 45 Como resultados experimentales, se confirmó que el extracto de Stauntonia hexaphylla tiene efectos sobre la promoción de la generación de tejido óseo y la prevención de enfermedades del tejido óseo, y por lo tanto, la presente invención tiene como objetivo proporcionar una composición farmacéutica y un medicamento para la promoción de la generación de hueso usando extracto de Stauntonia hexaphylla.
- 50 La publicación de solicitud de Patente Coreana No. 10-2013-0020095 se relaciona con una composición para la protección del hígado, que incluye extracto de Stauntonia hexaphylla. Se confirma que el extracto de Stauntonia hexaphylla derivado de una planta comestible está libre de efectos secundarios o problemas de seguridad, suprime significativamente la peroxidación lipídica en modelos animales tratados con tetracloruro de carbono o acetaminofén
- 55

5 para experimentos de toxicidad hepática, inhibe el aumento del nivel de GOT y GPT en suero, y tiene efectos sobre la protección del hígado, la prevención del daño hepático y la mejora de la función hepática. Por consiguiente, una composición de acuerdo con la presente invención es aplicable a composiciones farmacéuticas para el tratamiento o prevención de enfermedades hepáticas, composiciones alimenticias para la mejora de la función hepática o la protección hepática, o diversas aplicaciones relacionadas con la recuperación de la fatiga o el alivio de la resaca.

10 La publicación de solicitud de Patente Coreana No. 10-11675890 se relaciona con una composición antiinflamatoria que incluye extracto de fruta de Stauntonia hexaphylla como un ingrediente activo. El extracto de fruta de Stauntonia hexaphylla no es citotóxico y, a través de los resultados de los niveles de transcripción de ARNm de las citoquinas y las cantidades de secreción de NO relacionadas con la inflamación, se confirma que las frutas entre varias partes de Stauntonia hexaphylla inhiben más eficazmente la inflamación. La solicitud divulga un agente antiinflamatorio que incluye extracto de fruta de Stauntonia hexaphylla, que puede usarse en agentes antiinflamatorios que inhiben la inflamación de enfermedades relacionadas con la inflamación y composiciones cosméticas que tienen efectos antiinflamatorios.

15 La patente coreana No. 10-1243115 divulga un antipirético que incluye extracto de hoja de Stauntonia hexaphylla, como ingrediente activo, que no es citotóxico y tiene efectos antipiréticos superiores, en comparación con los antipiréticos convencionales.

20 La publicación de solicitud de Patente Coreana No. 10-1221617 se relaciona con una composición antiinflamatoria que incluye extracto de hoja de Stauntonia hexaphylla como un ingrediente activo. Particularmente, se divulga un agente antiinflamatorio que incluye extracto de hoja de Stauntonia hexaphylla que no es citotóxico y puede inhibir eficazmente la inflamación al reducir los niveles de transcripción de ARNm de las citoquinas relacionadas con la inflamación y las cantidades de secreción de NO e inhibir una enzima COX-2 que causa inflamación.

25 Sin embargo, la técnica relacionada difiere de la presente invención en que, en la presente invención, las fracciones en acetato de etilo se extraen del extracto en agua caliente de hoja de Stauntonia hexaphylla o del extracto en agua caliente de hoja de Stauntonia hexaphylla para usar el extracto de hoja de Stauntonia hexaphylla, como un material natural, como composición farmacéutica para tratar o prevenir la periodontitis u osteoporosis, y las fracciones extraídas se usan como composiciones para la promoción de la generación ósea, sus efectos se confirman a través de la actividad de ALP de osteoblastos y experimentos de promoción de diferenciación de osteoblastos y experimentos de promoción de generación de tejido óseo o cartilaginoso.

Divulgación

30 Problema técnico

35 Por lo tanto, la presente invención se ha realizado en vista de los problemas anteriores, y es un objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que incluya extracto de hoja de Stauntonia hexaphylla que promueva la generación de tejido óseo y se use para suprimir y tratar de manera segura daños del tejido óseo y cartilaginoso sin efectos secundarios incluso cuando el extracto de hoja de Stauntonia hexaphylla se toma durante mucho tiempo, como sustancia natural, como ingrediente activo.

Solución técnica

40 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, los objetos anteriores y otros pueden lograrse mediante la provisión de una composición farmacéutica, que incluye extracto crudo de hoja de Stauntonia hexaphylla o extracto soluble no polar como un ingrediente activo, para promover la generación de tejido óseo y se use para suprimir o tratar el daño al hueso y al tejido del cartílago.

El extracto de hoja de Stauntonia hexaphylla puede ser un extracto en uno cualquiera de agua, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol o mezclas de disolventes de estos. Un disolvente no polar puede ser uno cualquiera seleccionado entre hexano, cloroformo, diclorometano y acetato de etilo.

45 El extracto en agua caliente de hoja de Stauntonia hexaphylla puede aumentar las actividades de ALP generado en los osteoblastos y la diferenciación de osteoblastos, y las fracciones en acetato de etilo del extracto en agua caliente de hoja de Stauntonia hexaphylla pueden aumentar la actividad de ALP generado en los osteoblastos y la diferenciación de osteoblastos.

50 Además, el extracto de hoja de Stauntonia hexaphylla puede incluirse en una cantidad de 0.01 a 99.9 % en peso con base en la cantidad total de composiciones farmacéuticas, y una dosis diaria de la composición farmacéutica puede ser de 10 a 1000 mg por kg de peso corporal.

Efectos ventajosos

Una composición farmacéutica que incluye extracto en agua caliente de hoja de Stauntonia hexaphylla y fracciones en acetato de etilo del extracto en agua caliente de hoja de Stauntonia hexaphylla de acuerdo con la presente invención, como ingredientes activos, promueve la generación de tejido óseo o cartilaginoso promoviendo la actividad

de ALP y la diferenciación de osteoblastos y, por lo tanto, puede usarse como un medicamento para tratar o prevenir la periodontitis u osteoporosis

Descripción de los dibujos

5 La figura 1 es una vista esquemática que ilustra un proceso de preparación de extracto en agua caliente y fracciones de hoja de *Stauntonia hexaphylla*;

La figura 2 es un gráfico que ilustra la influencia del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* en la actividad de ALP (promoción de la formación ósea a través de la diferenciación de osteoblastos);

La figura 3 es un gráfico que ilustra la influencia del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* y las fracciones en acetato de etilo sobre la actividad de ALP; y

10 La figura 4 ilustra los resultados de tinción que muestran la actividad de ALP del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* y fracciones en acetato de etilo del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla*.

Mejor modo

15 La presente invención proporciona una composición farmacéutica, que incluye extracto de hoja de *Stauntonia hexaphylla* o un extracto soluble no polar como ingredientes activos, para la promoción de la generación de tejido óseo que se utilizará para suprimir y tratar el daño del tejido óseo y cartilaginosa, y un medicamento para la periodontitis u osteoporosis que incluye el mismo.

1. Preparación del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla*

20 La figura 1 ilustra una vista esquemática con respecto a un proceso de preparación del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* y fracciones. Se lavaron 10 kg de hojas de *Stauntonia hexaphylla* (*Stauntonia hexaphylla*) con agua destilada y luego se agregaron 200 L de agua destilada a este, seguido de extracción por calentamiento durante cuatro horas a 110 °C por medio de un portador medicinal eléctrico. La filtración se realizó por medio de un tamiz de malla 400 y luego la concentración se realizó por medio de un concentrador rotativo al vacío. Después de la filtración, los restos se extrajeron dos veces o más con la misma cantidad de agua destilada de la misma manera, y se sometieron a filtración y concentración al vacío. El extracto en agua caliente concentrado se liofilizó por medio de un liofilizador. De este modo, se obtuvo 1 kg de extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* (10 %).

2. Preparación de fracciones de hoja de *Stauntonia hexaphylla* solubles en disolventes polares y disolventes no polares

Como se ilustra en la figura 1, el extracto preparado en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* se fraccionó usando un disolvente orgánico como sigue.

30 2.1. Aislamiento de fracciones solubles de hexano

Se disolvieron por completo 250 g de extracto de hoja de *Stauntonia hexaphylla* obtenido en 5 L de agua destilada y luego se introdujo en un embudo de decantación. Se introdujeron 5 L de hexano en el embudo de decantación para separar una capa de hexano insoluble (capa de agua) y una capa de hexano soluble. Usando la capa de hexano insoluble (capa de agua), se repitió el mismo proceso tres veces, recolectando fracciones insolubles y solubles.

35 2.2. Aislamiento de fracciones solubles de cloroformo

Se añadieron 5 L de cloroformo a las fracciones en hexano insoluble (capa de agua), seguido de mezcla. Posteriormente, se separaron las fracciones en cloroformo soluble e insoluble. Usando la capa de cloroformo insoluble (capa de agua), se repitió el mismo proceso tres veces, recolectando fracciones en cloroformo insoluble y fracciones en cloroformo soluble.

40 2.3. Aislamiento de fracciones solubles de acetato de etilo.

Se añadieron 5 L de acetato de etilo a las fracciones insolubles de cloroformo (capa de agua), seguido de mezcla. Posteriormente, se separaron las fracciones en acetato de etilo solubles e insolubles. Usando una capa de acetato de etilo insoluble (capa de agua), se repitió el mismo proceso tres veces, recolectando fracciones en acetato de etilo insolubles y solubles.

45 2.4. Aislamiento de fracciones solubles de butanol

Se añadieron 5 L de butanol a fracciones insolubles de acetato de etilo (capa de agua), seguido de mezcla. Posteriormente, se separaron las fracciones en butanol solubles e insolubles. Usando una capa de butanol insoluble, el mismo proceso se repitió tres veces, recolectando fracciones en butanol insolubles y solubles.

2.5. Aislamiento de fracciones en la capa de agua.

Se disolvieron por completo 250 g de extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* en 5 L de agua destilada, seguido de la entrada a un embudo de decantación. A través del embudo de decantación, se fraccionaron la capa de hexano soluble, una capa de cloroformo soluble, la capa de acetato de etilo soluble y la capa de butanol soluble. Posteriormente, se eliminó el disolvente orgánico restante mediante concentración y se recolectaron fracciones en agua.

Utilizando 250 g del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* preparado a través del proceso de extracción en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* y el proceso de fraccionamiento, se concentraron al vacío las fracciones en hexano soluble, las fracciones en cloroformo soluble, las fracciones en acetato de etilo soluble y las fracciones en butanol soluble, seguido por liofilización. Como resultado fueron obtenidas y utilizadas como muestra, 0.02 g (0.015 %) de fracciones en hexano, 0.67 g (0.27 %) de fracciones en cloroformo, 2.62 g (1.05 %) de fracciones en acetato de etilo, 68.75 g (27.5 %) de fracciones en butanol, 150.14 g (60.06 %) de fracciones en agua.

3. Medición de la actividad AP y ALP en osteoblastos por extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla*

La figura 2 ilustra un gráfico que muestra la influencia del extracto en agua caliente de hojas de *Stauntonia hexaphylla* sobre la actividad de ALP (promoción de la formación ósea a través de la diferenciación de osteoblastos).

3.1 Medición de la actividad AP de los osteoblastos por extracto en agua caliente de la hoja de *Stauntonia hexaphylla*

Como los osteoblastos exhiben actividad ALP, se midió la influencia del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* obtenido, sobre la actividad ALP de los osteoblastos. En particular, las células C₂C₁₂ como células madre de osteoblastos se dividieron en alícuotas en una placa de 48 pozos en una cantidad de 5×10^4 células/pozo y se cultivaron en medio esencial de α -MEM, como medio de crecimiento celular, que contiene 10 % de FBS y 0.1 % de p/s por tres días. Tres días después, el medio se cambió con medio esencial α -MEM que incluía 1 % de suero de caballo y 0.1 % p/s para inducir la diferenciación de osteoblastos. Posteriormente, las células se trataron con 10 ng/ml de BMP-2 (proteína morfogénica ósea-2), y las muestras se trataron simultáneamente en concentraciones de 10 y 50 ug/ml, seguido de cultivo durante cinco días. Posteriormente, las células se trataron con un regulador de ensayo AP (kit) que incluye Triton X al 0.01 %, y se obtuvo una muestra necesaria para medir la actividad de ALP mediante centrifugación a 1000x g durante cinco minutos.

Usando ALP que descompone p-nitrofenilfosfato en p-nitrofenol y fosfato, la actividad de ALP se midió a través de cambios de absorbancia a 405 nm. Las concentraciones de proteínas se midieron usando un kit de análisis de proteínas BioRad. La actividad de ALP estuvo representada por PNP uM/min/mg de proteína.

3.2. Medición de la actividad de ALP en osteoblastos por extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla*

Los extractos en agua caliente de la hoja de *Stauntonia hexaphylla* obtenidos a través del proceso de extracción en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* y el proceso de fraccionamiento, se agregaron a células madre de osteoblastos (células C₂C₁₂) en concentraciones de 10 y 50 ug/ml, respectivamente. Las células tratadas se cultivaron durante cuatro días y luego se midió su influencia en la actividad ALP de los osteoblastos. Los resultados se ilustran como un gráfico en la figura 2. Como se ilustra en la figura 2, en el caso de un grupo experimental en el que BMP-2 y el extracto en agua caliente de la hoja de *Stauntonia hexaphylla* (10, 50 ug/ml) se tratan simultáneamente, la actividad de ALP aumenta de manera dependiente de la concentración, en comparación con un control tratado con BMP-2.

Además, cuando el extracto en agua caliente de la hoja de *Stauntonia hexaphylla* (10, 50 ug/ml) se trata solo, la actividad de ALP aumenta de manera dependiente de la concentración, en comparación con un control no tratado con BMP-2. Tales resultados muestran que el aumento de la actividad de ALP por el extracto en agua caliente de la hoja de *Stauntonia hexaphylla* tiene efectos sobre la diferenciación directa de osteoblastos y la promoción de la formación de hueso por el aumento de actividad, ya que el aumento de actividad de ALP como una enzima liberada por la diferenciación de osteoblastos y el aumento de actividad está directamente relacionado con la actividad de los osteoblastos y aumento de esta.

4. Medición de la actividad AP y ALP en osteoblastos por fracciones en acetato de etilo a partir de extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla*

La figura 3 es un gráfico que ilustra la influencia de las fracciones en acetato de etilo del extracto en agua caliente de la hoja de *Stauntonia hexaphylla* sobre la actividad de ALP.

4.1 Medición de la actividad AP de osteoblastos por fracciones en acetato de etilo a partir de extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla*

Como los osteoblastos exhiben actividad ALP, se midió la influencia de las fracciones en acetato de etilo del extracto obtenido en agua caliente de la hoja de *Stauntonia hexaphylla* sobre la actividad ALP de los osteoblastos. En particular, las células C₂C₁₂ como células madre de osteoblastos se dividieron en alícuotas en una placa de 48 pozos en una

cantidad de 5×10^4 células/pozo y se cultivaron en medio esencial de α -MEM, como medio de crecimiento celular, que contiene 10 % de FBS y 0.1 % de p/s durante tres días.

5 Tres días después, el medio se cambió con medio esencial α -MEM que incluye 1 % de suero de caballo y 0.1 % de p/s para inducir la diferenciación de osteoblastos. Posteriormente, las células se trataron con 10 ng/ml de BMP-2 (proteína morfogénica ósea-2), y simultáneamente se trataron con HP20-2 eluido en columna HP20-2 de fracciones en butanol del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* en concentraciones de 10 y 50 ug/ml, respectivamente, seguido de cultivo durante cinco días. Posteriormente, las células se trataron con un regulador de ensayo AP (kit) que incluye Triton X al 0.01 %, y se obtuvo una muestra necesaria para medir la actividad de ALP mediante centrifugación a 1000x g durante cinco minutos.

10 Usando ALP que descompone p-nitrofenilfosfato en p-nitrofenol y fosfato, la actividad de ALP se midió a través de cambios de absorbancia a 405 nm. Las concentraciones de proteínas se midieron usando un kit de análisis de proteínas BioRad. La actividad de ALP estuvo representada por PNP uM/min/mg de proteína.

4.2 Medición de la actividad AP en osteoblastos por fracciones en acetato de etilo del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla*

15 Las fracciones en acetato de etilo (5, 10 ug/ml) de los extractos en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* fueron respectivamente a células madre de osteoblastos (células C₂C₁₂) en concentraciones de 10 y 50 ug/ml, respectivamente. Las células tratadas se cultivaron durante cuatro días y luego se midió su influencia sobre la actividad ALP de los osteoblastos. Los resultados se ilustran como un gráfico en la figura 3. Como se ilustra en la figura 3, en el caso de un grupo experimental en el que BMP-2 y las fracciones en acetato de etilo (10, 50 ug/ml) de extracto en
20 agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* se tratan simultáneamente, la actividad de ALP de este aumenta de manera dependiente de la concentración, en comparación con un control tratado con BMP-2.

Además, cuando las fracciones en acetato de etilo (10, 50 ug/ml) del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* se tratan solas, la actividad de ALP aumenta de manera dependiente de la concentración, en comparación
25 con un control no tratado con BMP-2. Dichos resultados muestran que la actividad de ALP aumenta por las fracciones en acetato de etilo del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* de acuerdo con la presente invención, tiene efectos sobre la diferenciación directa de osteoblastos y la promoción de la formación ósea por el aumento de actividad ya que el aumento de actividad de ALP como enzima liberada por diferenciación de osteoblastos y el aumento de la actividad están directamente relacionados con la actividad de los osteoblastos y su aumento.

30 4.3 Tinción para medir la actividad AP en osteoblastos por fracciones en acetato de etilo del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla*

Las células C₂C₁₂ como células madre de osteoblastos se dividieron en alícuotas en una placa de 48 pozos en un número de 5×10^4 células/pozo y se cultivaron en medio esencial de α -MEM, como medio de crecimiento celular, que contiene 10 % de FBS y 0.1 % de p/s durante tres días. Tres días después, el medio se cambió con medio esencial
35 α -MEM que incluye 1 % de suero de caballo y 0.1 % de p/s para inducir la diferenciación de osteoblastos. Posteriormente, las células se trataron con 10 ng/ml de BMP-2 (proteína morfogénica ósea-2), y las muestras se trataron simultáneamente de forma dependiente de la concentración, seguido de cultivo durante cinco días.

En la presente invención, los grupos se clasificaron en un control positivo tratado con BMP-2 (10 ng/ml) como un inductor de diferenciación de osteoblastos, un grupo experimental tratado con fracciones en acetato de etilo del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* (5, 10ug/ml) solo y un grupo de control no tratado sin
40 tratamiento, los grados de diferenciación de osteoblastos de los mismos se midieron respectivamente a través de la tinción del sitio de actividad de AP usando un sustrato NBT/BCIP.

En particular, los medios de las células cultivadas durante cinco días se eliminaron y las células se lavaron con 1xPBS tres veces. Las células se fijaron a temperatura ambiente durante 15 minutos por medio de una solución de formalina al 10 % y se lavaron con 1xPBS tres veces para eliminar el resto de formalina. Las células se volvieron a lavar con
45 una solución de 1x fosfato alcalino y luego, los sitios de actividad de AP de estas se tiñeron con una solución de sustrato NBT/BCIP.

La figura 4 ilustra los resultados de tinción de actividad de ALP para grupos con extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* y fracciones en acetato de etilo del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla*. Como se ilustra en la figura 4, se puede confirmar que, en el caso del control positivo tratado con BMP-2 solo, las células están más teñidas con NBT/BCIP, en comparación con el grupo de control no tratado con BMP-2 y la muestra.
50

Se puede confirmar que, en el caso del grupo experimental tratado solo con las fracciones en acetato de etilo (5, 10ug/ml) de extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla*, las células están más teñidas con NBT/BCIP, en comparación con el grupo control no tratado con BMP-2 y la muestra.

55 Como ALP es una enzima liberada por la diferenciación y el aumento de la actividad de los osteoblastos y, por lo tanto, el aumento de la actividad de ALP está directamente relacionado con la actividad de los osteoblastos y su aumento, se puede considerar que la actividad de ALP aumenta por las fracciones en acetato de etilo del extracto en agua

caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla*, de acuerdo con la presente invención provoca efectos de promoción de la formación ósea a través de la diferenciación directa de osteoblastos y el aumento de la actividad.

5 5. Composición farmacéutica para la promoción de la generación de tejido óseo y cartilaginoso y medicamentos para prevenir la periodontitis u osteoporosis, que incluye el extracto de hoja de *Stauntonia hexaphylla* como un ingrediente activo

10 Un medicamento que incluye una composición farmacéutica para promover la formación de tejido óseo o cartilaginoso, para prevenir o tratar la periodontitis u osteoporosis puede formularse en forma de un polvo, un gránulo, un comprimido, una cápsula, una suspensión, una emulsión, un jarabe, un aerosol, una formulación epidérmica, un supositorio o una solución de inyección estéril de manera que la composición se incluya en una cantidad de 0.01 a 99.9 % en peso.

En el caso de la solución de inyección estéril, la composición farmacéutica puede incluirse en una cantidad de 0.01 a 99.9 % en peso y mezclarse con 99.9 a 0.01 % en peso de agua destilada o glucosa. En el caso de la cápsula, la composición farmacéutica puede liofilizarse para incluirse en una cantidad de 0.01 a 99.9 % en peso y mezclarse con 99.9 a 0.01 % en peso de vitaminas o calcio.

15 Una cantidad de administración diaria de la composición farmacéutica preparada incluye el extracto en una cantidad de 10 a 1000 mg por kg de peso corporal.

Además, se pueden preparar alimentos para la salud funcionales para mejorar o prevenir la periodontitis u osteoporosis que incluyen del 0.01 al 99.9 % en peso de la composición farmacéutica.

Aplicabilidad industrial

20 Dado que de acuerdo con la presente invención se confirma que el extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* y las fracciones en acetato de etilo del extracto en agua caliente de hoja de *Stauntonia hexaphylla* promueve la generación de tejido óseo o cartilaginoso al promover la actividad de ALP de los osteoblastos y la diferenciación de osteoblastos, una composición farmacéutica que incluye el extracto de hoja de *Stauntonia hexaphylla* como un ingrediente activo puede usarse como medicamento para tratar o prevenir la periodontitis u osteoporosis.
25 Además, los costes de producción pueden reducirse ya que una planta de la naturaleza se utiliza como materia prima y, a través de la industrialización de esta, se pueden anticipar los efectos de sustitución de importación y exportación.

Aunque las realizaciones preferidas de la presente invención se han divulgado con fines ilustrativos, las personas experimentadas en la técnica apreciarán que son posibles diversas modificaciones, adiciones y sustituciones, sin apartarse del alcance y espíritu de la invención como se divulga en las reivindicaciones adjuntas.

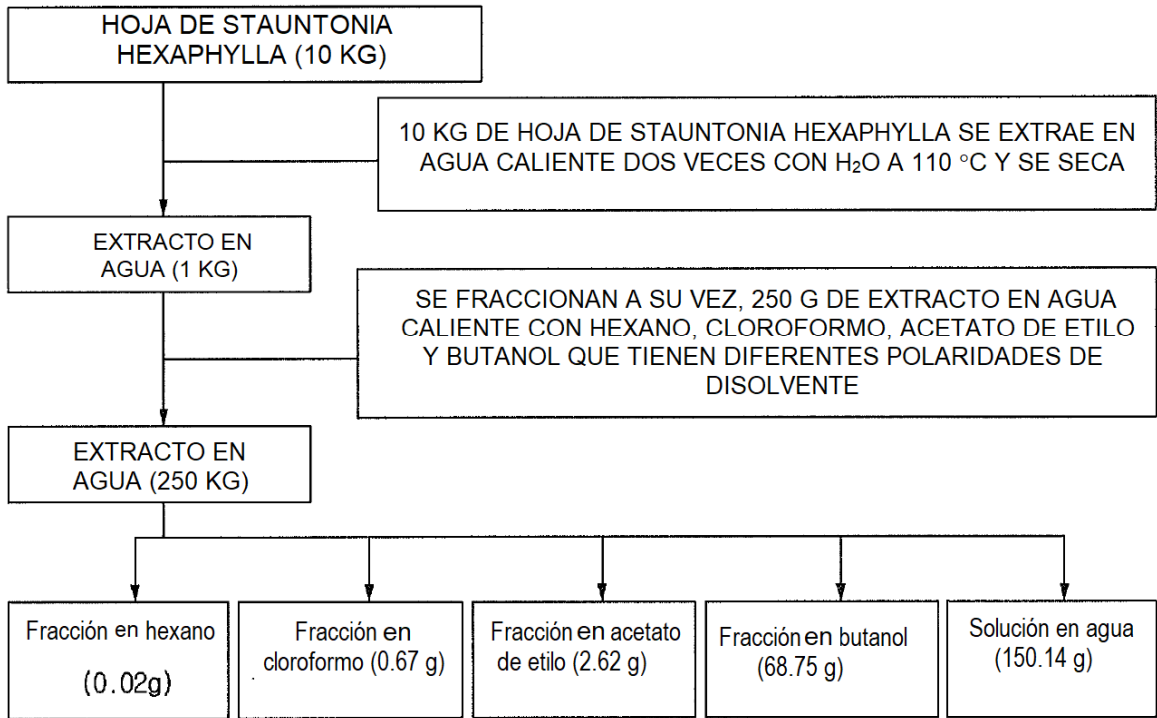
30

REIVINDICACIONES

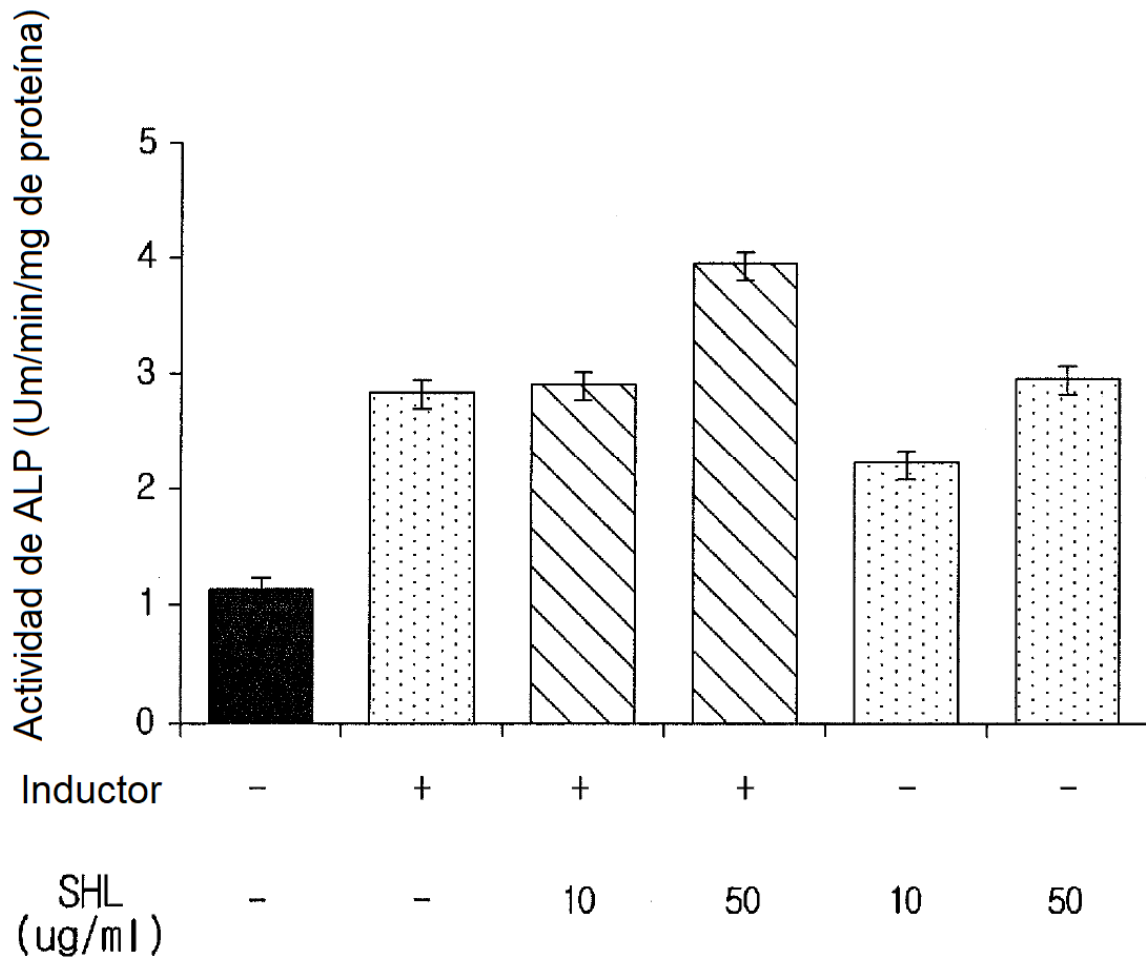
- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende extracto de hoja cruda de *Stauntonia hexaphylla* o extracto de hoja soluble en disolvente no polar como ingrediente activo, para su uso en la promoción de la formación de tejido óseo o cartilaginoso en un sujeto que lo necesite, en donde la promoción de la formación de hueso se logra aumentando la diferenciación directa de osteoblastos y actividad de osteoblastos.
2. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el extracto crudo de hoja de *Stauntonia hexaphylla* es soluble en uno cualquiera seleccionado de agua, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol o mezclas de disolventes de estos.
- 10 3. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el extracto soluble en disolvente no polar de hoja de *Stauntonia hexaphylla* es el producto de fraccionamiento del extracto de hoja cruda definido en la reivindicación 2, el fraccionamiento usando uno cualquiera seleccionado de hexano, cloroformo, diclorometano y acetato de etilo como disolvente no polar.
4. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el extracto está comprendido en una cantidad de 0.01 a 99.9 % en peso de la composición.
- 15 5. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la composición es administrable en una dosis diaria del extracto es de 10 a 1000 mg por kg de peso corporal.
6. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde la composición se formula en una forma tal como un polvo, un gránulo, un comprimido, una cápsula, una suspensión, una emulsión, un jarabe, un aerosol, una formulación epidérmica, un supositorio o una solución de inyección estéril.
- 20 7. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el extracto es para uso para prevenir o tratar la periodontitis o la osteoporosis.
8. Un alimento para la salud funcional para uso en el tratamiento o prevención de periodontitis u osteoporosis, que comprende del 0.01 al 99.9 % en peso de la composición farmacéutica para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

25

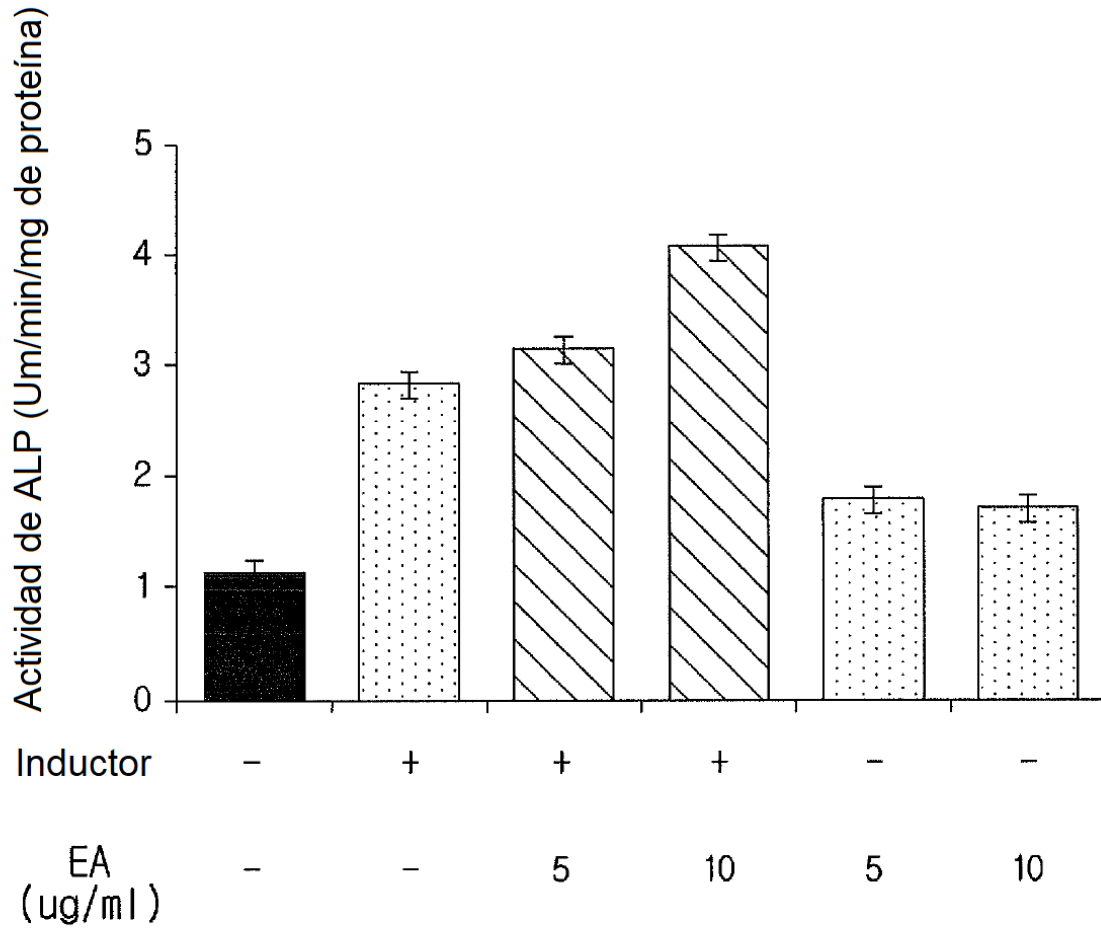
FIG. 1



[FIG. 2]



[FIG. 3]



[FIG. 4]



Inductor	-	+	-	-	-	-
SHL (ug/ml)	-	-	Agua caliente 10	Agua caliente 50	EA 5	EA 10