(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 773 846**

(51) Int. CI.:

A61K 36/36 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2014 PCT/EP2014/071987**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015 WO15055633**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2014 E 14793029 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3057602**

(54) Título: **Extracto de planta medicinal**

(30) Prioridad:

16.10.2013 EP 13188906

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.07.2020

(73) Titular/es:

UNIVERSITY OF ANTWERP (50.0%)
Departement Onderzoek - Middelheimcampus,
Middelheimlaan 1, M.A. 124
2020 Antwerpen, BE y
AVICENNA DEVELOPMENT (50.0%)

(72) Inventor/es:

PIETERS, LUC;
APERS, SANDRA;
THEUNIS, MART;
VAECK, MARK;
EL MAZOUARI, KHALIL y
CHERRAH, YAHIA

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

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

Extracto de planta medicinal

Campo de la invención

La solicitud se refiere a extractos de plantas medicinales y a su uso en el tratamiento de enfermedades, más particularmente enfermedades causadas por la presencia de cálculos en los conductos del sistema digestivo.

Antecedentes

La bilis presente en la vesícula biliar puede endurecerse en pedazos de material similar a la piedra que, cuando se empuja fuera de la vesícula biliar puede obstruir no solo el conducto cístico y el conducto biliar común sino también los conductos vecinos, como los conductos hepático o pancreático. Esto puede dar lugar a enfermedades como la colelitiasis, coledocolitiasis, que puede provocar colangitis, ictericia obstructiva y pancreatitis. A pesar de la frecuencia de estas afecciones, el tratamiento clínico de los cálculos identificados en los conductos biliares en el intestino se basa casi exclusivamente en la extracción del conducto biliar por colecistectomía.
La colecistectomía, aunque es un procedimiento establecido, todavía conlleva una tasa de complicaciones pequeña pero existente, especialmente cuando se realiza en un entorno agudo. Alrededor del 20 % de los pacientes continúan sufriendo dolor después de la colecistectomía, y se prescribe terapia sintomática con analgesia (medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), analgésicos narcóticos). La terapia de disolución médica con ácido ursodesoxicólico (UDCA) es una alternativa para pacientes que experimentan síntomas moderados debido a los cálculos biliares de colesterol. Los principales inconvenientes de este tratamiento son la baja eficacia, lentitud en la acción y la posibilidad de recurrencia de cálculos.

Los medicamentos que influyen en la síntesis hepática y/o la secreción de colesterol como las estatinas, y/o la absorción intestinal de colesterol como la ezetimiba podrían influir en la formación de cálculos biliares de colesterol y promover la disolución de los cálculos biliares, pero este concepto aún no se ha probado en la clínica. Además, Los fármacos químicos sintéticos a menudo tienen efectos secundarios.

Se usa *Herniaria hirsuta* L. (Caryophyllaceae), nativa de Eurasia y África del Norte, en medicina popular para el tratamiento de la litiasis o como diurético (Atmani et al., 2004, Journal of Ethnopharmacology 139:728-738; Mbark et al., 2000, Die Pharmazie 55:690-692).

Varios otros informes sugieren un efecto de los extractos de *Herniaria hirsuta* en los cálculos renales (Altmani et al. 2004, J. of Etnopharmacology, 95(1):87-93; Altmani et al. 2004, J. of Urology, 172(3):1510-1514; Meiouet et al. 2011, Progres en Urologie 21(1):40-47; Grases et al. 1995, J; of Enthnopharmacology, 45(3): 211-214; Nagal et al. 2013, Indo Global Journal of Pharmaceutical science 3(1): 6-14).

Sumario de la invención

En este documento se proporcionan extractos de *Herniaria hirsuta* que comprenden uno o más flavonoides de *Herniaria hirsuta* y una o más saponinas de *Herniaria hirsuta* para su uso en la prevención y/o tratamiento de colelitiasis o coledocolitiasis, caracterizado por que es un extracto normalizado de *Herniaria hirsuta* que comprende uno o más flavonoides de *Herniaria hirsuta* y una o más saponinas de *Herniaria hirsuta* y que la cantidad total de flavonoides está entre 0,5 % y 7 % y la cantidad total de saponinas está entre 5 % y 18 %. Más particularmente, se muestra que los extractos proporcionados en el presente documento evitan el aumento del colesterol biliar y, por lo tanto, evitan la formación de lodo biliar y cálculos biliares. Los extractos proporcionados en el presente documento son, por lo tanto, de particular interés en el tratamiento de pacientes con alto riesgo de desarrollar enfermedades como la colelitiasis. Más en particular, se ha encontrado que la administración de entre 30 mg y 70 mg/kg de peso corporal por día de un extracto de *Herniaria hirsuta*, más en particular, la administración de entre 40 mg y 60 mg/kg de peso corporal por día de un extracto de *Herniaria hirsuta* en el que la cantidad total de saponinas de *Herniaria hirsuta* está entre el 5 % y el 18 %, y que además contiene flavonoides, es particularmente efectivo en la prevención y/o tratamiento de estas enfermedades. En realizaciones particulares, el extracto se administra a una dosificación tal que se administran entre 3,6 mg y 8,4 mg/kg de peso corporal de saponinas de *Herniaria hirsuta* por día.
Los extractos de *Herniaria hirsuta* contemplados en el presente documento son para su uso en el tratamiento y/o prevención de colelitiasis o coledocolitiasis.
En realizaciones particulares, los extractos de *Herniaria hirsuta* contemplados en el presente documento son para su uso en un método para reducir el colesterol biliar.

Se ha encontrado además que los efectos ventajosos descritos anteriormente pueden obtenerse de manera óptima con composiciones que son extractos normalizados de *Herniaria hirsuta*. Se entenderá que, dependiendo de la concentración de los componentes en los extractos, el experto en la materia puede determinar diferentes formas de dosificación para los métodos descritos anteriormente.
En realizaciones particulares, los extractos normalizados de *Herniaria hirsuta* contemplados en el presente documento se caracterizan por que las saponinas de *Herniaria hirsuta* comprendidas en los mismos incluyen uno o más de

heptaglucósido de ácido hidroximedicagénico y heptaglucósido de ácido medicagénico.
En otras realizaciones particulares, los extractos normalizados de *Herniaria hirsuta* contemplados en el presente documento se caracterizan porque comprenden las saponinas de *Herniaria hirsuta* heptaglucósido del ácido hidroxmedicagénico y heptaglucósido del ácido medicagénico.
En realizaciones particulares, los extractos normalizados de *Herniaria hirsuta* contemplados en el presente documento se caracterizan porque los flavonoides de *Herniaria hirsuta* comprendidos en los mismos incluyen uno o más de quercetina-3-*O*-(2-*O*-rhamnosil)glucurónido, rutina e isorhamnetina-3-*O*-rutinósido.
En otras realizaciones particulares, los extractos normalizados de *Herniaria hirsuta* contemplados en el presente documento se caracterizan porque comprenden los flavonoides de *Herniaria hirsuta* quercetina-3-*O*-(2-*O*-rhamnosil)glucurónido, rutina e isorhamnetina-3-O-rutinósido.
En realizaciones particulares, los extractos normalizados de *Herniaria hirsuta* previstos en el presente documento son para su uso como se ha descrito anteriormente, en donde dicha prevención y/o tratamiento comprende la administración de dicho extracto a un paciente que lo necesite a una dosificación entre 0,5 g de extracto/día y 10,0 g de extracto/día.

En el presente documento se describen métodos para producir extractos de *Herniaria hirsuta* y un método analítico validado, que permite la generación de extractos que tienen una o más de las propiedades previstas en el presente documento.
Más particularmente, se divulgan en el presente documento métodos para producir material de extracto normalizado de *Herniaria hirsuta,* caracterizado por las etapas de poner en contacto del material vegetal de *Herniaria hirsuta,* con un fluido de extracción para extraer al menos los flavonoides y saponinas del mismo; determinar la cantidad de saponinas de *Herniaria hirsuta* en el extracto así obtenido; y obtener a partir del mismo un material de extracto en donde la cantidad total de saponinas de *Herniaria hirsuta* es entre 5 % y 18 %.

El material de extracto caracterizado por la cantidad especificada de saponinas de *Herniaria hirsuta* puede asegurarse mezclando diferentes lotes de extractos de *Herniaria hirsuta*, o mezclando con uno o más excipientes inertes (dilución).

La memoria descriptiva proporciona además extractos normalizados de *Herniaria hirsuta*, obtenibles por los métodos descritos en el presente documento.

Figuras

La siguiente descripción de las figuras de realizaciones específicas es simplemente de naturaleza ejemplar y no pretende limitar las presentes enseñanzas, su aplicación o sus usos.

Figura 1: Perfil de HPLC de un extracto normalizado de *Herniaria hirsuta* según se obtiene utilizando el método validado previsto en el presente documento. Los diferentes picos identificados corresponden a: 1 derivado de ácido cafeico, 2-6 flavonoides, 7-9 saponinas.
Figura 2: Ensayo *In vivo* de un extracto normalizado; a) representación gráfica del nivel de colesterol en la bilis a lo largo del tiempo para los diferentes grupos experimentales; b) representación gráfica del nivel de colesterol en la sangre a lo largo del tiempo para los diferentes grupos experimentales.

Descripción detallada

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en singular y plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa.
Los términos "que comprende", "comprende" y "compuesto de" como se usan en el presente documento son sinónimos de "que incluye", "que incluye" o "que contiene", "contiene" y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas del método no citados, adicionales. No obstante, donde se usa el término que comprende para referirse a la presencia de una serie de elementos o etapas, esto también incluye realizaciones que se caracterizan por que consisten solo en los elementos y etapas mencionados.
La enumeración de intervalos numéricos por valores extremos incluye todos los números y fracciones abarcados dentro de los intervalos respectivos, así como los valores extremos enumerados.
El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de y desde el valor especificado, en particular variaciones del +/- 10 % o menos, preferentemente del +/- 5 % o menos, más preferentemente del +/- 1 % o menos, y aún más preferentemente del +/- 0,1 % o menos de y desde el valor especificado, en la medida en que tales variaciones sean apropiadas para funcionar en la invención divulgada. Debe entenderse que el valor al que se refiere el modificador "aproximadamente" también se divulga de forma específica y preferente.
La expresión "extracto normalizado" como se usa en el presente documento se refiere al hecho de que el extracto contiene una concentración bien definida de constituyentes activos o compuestos marcadores. Más particularmente, la expresión "extracto de Hh normalizado" como se menciona en el presente documento, se refiere a un extracto, tal como, entre otros, extractos obtenibles por los métodos descritos en el presente documento, en el que la cantidad total de saponinas está entre 5 % y 18 %, y que además comprende flavonoides.

La solicitud prevé el uso de extractos de *Herniaria hirsuta*, más particularmente extractos de *Herniaria hirsuta* caracterizados por concentraciones bien definidas de saponinas y la presencia de flavonoides en métodos terapéuticos. De hecho, mientras que las propiedades terapéuticas han sido atribuidas a los extractos de *Herniaria hirsuta* en el pasado, la eficacia de estos extractos era limitada y los efectos carecían además de reproducibilidad. Ahora se ha encontrado que extractos de *Herniaria hirsuta,* más particularmente caracterizados por concentraciones bien definidas de saponinas y la presencia de flavonoides, son efectivos en la prevención y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con el desarrollo de cálculos en los conductos del tracto digestivo. Más en particular, las enfermedades previstas son enfermedades relacionadas con el desarrollo de cálculos en el conducto cístico y biliar común, así como los conductos hepáticos o pancreáticos.

Las enfermedades previstas incluyen, aunque sin limitación, discinesia biliar, más particularmente colelitiasis, coledocolitiasis y enfermedades relacionadas como la colangitis, ictericia obstructiva y pancreatitis.

En realizaciones particulares, la invención proporciona extractos para su uso en la reducción del colesterol biliar. Más en particular, se prevén métodos mediante los cuales la administración del extracto asegura una disminución del colesterol biliar de más del 30 %, tal como del 35 %, pero más particularmente del 40 %, del 45 % o más del 50 %.

Los extractos contemplados en el presente documento son particularmente adecuados para la prevención de las enfermedades mencionadas anteriormente en sujetos con alto riesgo de desarrollar estas enfermedades. Los factores de riesgo para desarrollar estas enfermedades incluyen, entre otros, ser mujer, tener 60 años o más, tener sobrepeso u obesidad, estar embarazada, comer una dieta alta en grasas y una dieta alta en colesterol. Los extractos de la invención están previstos para la prevención y el tratamiento de la colelitiasis o coledocolitiasis en sujetos que tienen uno o más de estos factores de riesgo.

En realizaciones particulares, se prevé que los extractos para uso según la invención sean de particular interés para sujetos obesos y/o con una dieta alta en grasas o colesterol.

Los métodos descritos en el presente documento implican administrar a un mamífero, tal como un ser humano o un animal mamífero, una cantidad efectiva de una composición que comprende un extracto de *Herniaria hirsuta*. La dosificación de la composición dependerá de la concentración del extracto. En realizaciones particulares, la composición comprende material de extracto de *Herniaria hirsuta* en el que la cantidad total de saponinas esté entre el 5 % y el 18 % y que además contiene flavonoides. Se ha descubierto que, donde se prevé el uso de dicho material normalizado, la dosificación óptima puede variar entre 0,5 g/día y 10,0 g/día, más particularmente entre 2,0 g/día y 8,0 g/día, más particularmente entre 3,0 g/día y 6,0 g/día.

Como alternativa, se prevé que un extracto de *Herniaria hirsuta* y, más particularmente, el extracto de Hh normalizado según lo previsto en el presente documento, pueda administrarse a una dosis diaria entre 30 mg/kg de peso corporal y 70 mg/kg de peso corporal, o entre 40 mg/kg de peso corporal y 60 mg/kg de peso corporal, o entre 45 mg/kg de peso corporal y 55 mg/kg de peso corporal. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple. En particular el extracto de *Herniaria hirsuta* y, más particularmente, el extracto de Hh normalizado como se prevé en el presente documento, se puede administrar dos veces al día a una dosis entre 15 mg/kg de peso corporal y 35 mg/kg de peso corporal, o entre 20 mg/kg de peso corporal y 30 mg/kg de peso corporal, o entre 22,5 mg/kg de peso corporal y 27,5 mg/kg de peso corporal.

Los extractos de *Herniaria hirsuta* previstos en el presente documento se caracterizan por una concentración bien definida de saponinas de *Herniaria hirsuta* y la presencia de flavonoides de *Herniaria hirsuta*. Donde la concentración del extracto de *Herniaria hirsuta* difiere del normalizado previsto anteriormente, la dosificación puede ser ajustada en consecuencia por la persona experta. Se prevé que se logren efectos óptimos cuando los métodos abarcan la administración de entre 3,0 mg y 8,4 mg/kg de peso corporal de saponinas de *Herniaria hirsuta* por día. En realizaciones particulares se ha encontrado que la cantidad de flavonoides de *Herniaria hirsuta* presentes en la composición a administrar está entre 0,5 % y 7 %. En otras realizaciones particulares, la cantidad de flavonoides presentes en el extracto está entre 4-5 %. En base a esto, se logran efectos óptimos cuando los métodos abarcan la administración de entre 0,15-3,5 mg/kg de peso corporal de flavonoides por día. Las composiciones pueden tomar una variedad de formas tales como píldoras, caramelos, pastillas para chupar, polvos, geles, comprimidos, bebidas, productos nutricionales y similares.

Una "cantidad efectiva" de una composición es la cantidad de dicha composición, y más particularmente del extracto proporcionado en el presente documento, requerida y suficiente para obtener una respuesta adecuada para prevenir o tratar o reducir la indicación médica prevista o específica. Tal respuesta puede requerir administraciones sucesivas de la composición. La cantidad efectiva puede variar aún más dependiendo de la salud y la condición física del individuo que se va a tratar, la edad del individuo que se va a tratar, la capacidad del sujeto para responder de manera efectiva, la naturaleza de la composición (formulación) y otros factores relevantes. La cantidad efectiva puede variar aún más dependiendo de si se usa en monoterapia o en terapia combinada.

En los métodos de prevención y tratamiento previstos en el presente documento, el sujeto puede ser un adulto, un niño o un lactante.

En realizaciones particulares, los métodos previstos en el presente documento comprenden la administración de un extracto de *Herniaria hirsuta*, más particularmente el extracto normalizado de Hh previsto en el presente documento, durante un determinado periodo de tiempo. Por lo general, el periodo de tiempo se extiende entre 30 días y 3 años. En realizaciones particulares, el periodo de tiempo es un periodo de más de 3 meses, más particularmente entre 4 y 6 meses y aún más particularmente, 4, 5 o 6 meses.

Se describen en el presente documento métodos para proporcionar extractos normalizados de *Herniaria hirsuta*, que pueden usarse para la preparación de composiciones terapéuticas. Los métodos para producir material de extracto normalizado de *Herniaria hirsuta*, comprende las etapas de generar un extracto del material vegetal *Herniaria hirsuta*,

determinar la cantidad de saponinas de *Herniaria hirsuta* y la presencia de flavonoides en el extracto así obtenido y obtener a partir del mismo un material de extracto de *Herniaria hirsuta* con una concentración bien definida de saponinas. Por ejemplo, los métodos implican generar material de extracto en el que la cantidad total de saponinas de *Herniaria hirsuta* es entre 5 % y 18 %. El extracto se caracteriza además porque la cantidad total de flavonoides de *Herniaria hirsuta* está entre 0,5 % y 7 %.

Por consiguiente, se describen métodos para producir un extracto de *Herniaria hirsuta*, más particularmente un extracto de *Herniaria hirsuta* terapéuticamente efectivo, que comprenden las etapas de poner en contacto el material vegetal de *Herniaria hirsuta,* con un fluido de extracción para extraer al menos los flavonoides y saponinas del mismo; determinar la cantidad de saponinas de *Herniaria hirsuta* y la presencia de flavonoides en el extracto así obtenido; y obtener a partir del mismo un material de extracto en donde la cantidad total de saponinas de *Herniaria hirsuta* está entre 5 % y 18 %, y en donde están presentes flavonoides de *Herniaria hirsuta*. Los métodos pueden abarcar además determinar la cantidad de flavonoides de *Herniaria hirsuta* en el extracto. Los métodos pueden abarcar la obtención de un material de extracto en el que la cantidad total de flavonoides de *Herniaria hirsuta* está entre 0,5-7 %. En realizaciones adicionales de los métodos descritos en el presente documento, la cantidad total de flavonoides de *Herniaria hirsuta* está entre 2 % y 7 %.

El método por el cual se obtiene el extracto de *Herniaria hirsuta* no es crítico. De hecho, para el experto en la materia estará claro que los extractos que comprenden al menos flavonoides y saponinas pueden obtenerse a partir del material vegetal de diferentes maneras. Por lo tanto, el material vegetal puede ponerse en contacto con diferentes fluidos, como por ejemplo, acetato de etilo, etanol, metanol, acetona y combinaciones de los mismos.

La solicitud describe además un método optimizado, pero solo ejemplar, para la generación de un extracto de *Herniaria hirsuta* adecuado para la generación de composiciones terapéuticas, es decir, desprovisto de compuestos en exceso que serían tóxicos y que comprenden cantidades adecuadas de saponinas y flavonoides. Más particularmente, el proceso comprende las etapas de extraer el material vegetal de *Herniaria hirsuta* en agua hirviendo que separa el material vegetal insoluble de la fase acuosa; y concentrar el soluto contenido en la fase acuosa. El soluto concentrado puede ser sometido a liofilización, secado por pulverización, evaporación o ultrafiltración.

Como se ha detallado anteriormente, los métodos para la generación del extracto de *Herniaria hirsuta* previsto en el presente documento comprenden además la etapa de determinar la cantidad de saponinas de *Herniaria hirsuta* y la presencia de flavonoides de *Herniaria hirsuta* en el extracto obtenido. Los métodos pueden comprender la etapa de determinar la cantidad saponinas y flavonoides de *Herniaria hirsuta* en el extracto.

Los expertos en la materia conocen métodos adecuados para determinar la cantidad de saponinas y la presencia de flavonoides en un extracto. Por ejemplo, el extracto puede analizarse mediante un método cromatográfico tal como, aunque sin limitación, HPLC. Por lo general, la cuantificación o identificación de los componentes se realizará utilizando patrones. Más en particular, la cuantificación o identificación puede garantizarse mediante el uso de un patrón de flavonoide y/o saponina. Los patrones de flavonoides y saponinas adecuados para la determinación de los flavonoides y las saponinas de *Herniaria hirsuta* están disponibles en la técnica e incluyen, entre otros, los compuestos flavonoides rutina, quercetina o quercitrina y las saponinas α-hederacósido C, alfa-hederina y hederagenina.

Para obtener un material adecuado para la generación de una composición terapéutica, los métodos previstos en el presente documento comprenden además la etapa de generar, a partir de uno o más de los extractos de *Herniaria hirsuta* así obtenidos, un material de extracto de *Herniaria hirsuta* con una concentración bien definida de saponinas, en el que además están presentes flavonoides. El material de extracto de *Herniaria hirsuta* para su uso como se define en las reivindicaciones, comprende una cantidad total de saponinas entre 5 % y 18 % y una cantidad total de flavonoides entre 0,5 % y 7 %, más particularmente entre 2 % y 7 %. Por lo tanto, los métodos pueden comprender determinar si la cantidad total de saponinas está entre 5 % y 18 % y si la cantidad total de flavonoides en el extracto está entre 0,5 % y 7 %, más particularmente entre 2 % y 5 %.

En realizaciones adicionales, los métodos descritos en el presente documento pueden comprender mezclar diferentes lotes de extractos de *Herniaria hirsuta*. En realizaciones particulares, donde la cantidad total de saponinas no corresponde a la cantidad prevista, los métodos descritos en el presente documento pueden comprender la etapa de mezclar un lote de extracto que comprende una concentración más baja con un lote que comprende una concentración más alta de saponinas. En otras realizaciones particulares, los métodos comprenden determinar si la cantidad total de saponinas es aproximadamente del 9-13 %. Los métodos pueden comprender determinar si, además, la cantidad total de flavonoides está entre 0,5-7 %. Los métodos pueden comprender determinar si la cantidad total de saponinas está entre el 9-13 % y la cantidad total de flavonoides está entre el 4-6 %.

Para alcanzar la concentración objetivo para los constituyentes fitoquímicos, puede mezclarse uno o más lotes de extracto de *Herniaria hirsuta* con uno o más excipientes inertes (dilución).

La solicitud proporciona extractos de *Herniaria hirsuta,* para su uso en la prevención y el tratamiento de la colelitiasis o coledocolitiasis.

La *Herniaria hirsuta* L. (Caryophyllaceae), es una planta originaria de Eurasia y el norte de África, pero actualmente también se encuentra en Europa. Los extractos de *Herniaria hirsuta* descritos en el presente documento contienen saponinas como componentes principales y también comprenden flavonoides. Más en particular, los extractos de *Herniaria hirsuta* se caracterizan por la presencia de saponinas y flavonoides de *Herniaria hirsuta*. De hecho, las saponinas y los flavonoides presentes son característicos de *Herniaria hirsuta,* tal que un extracto de *Herniaria hirsuta* diferirá de un extracto de otra planta, o incluso del de otra especie de *Herniaria*.

En realizaciones particulares, los extractos normalizados de *Herniaria hirsuta* para su uso según lo previsto en el presente documento se caracterizan porque las saponinas de *Herniaria hirsuta* comprendidas en los mismos incluyen

uno o más de heptaglucósido de ácido hidroximedicagénico y heptaglucósido de ácido medicagénico.
En otras realizaciones particulares, los extractos normalizados de *Herniaria hirsuta* para su uso como se prevé en el presente documento se caracterizan porque comprenden las saponinas de *Herniaria hirsuta* heptaglucósido del ácido hidroximedicagénico y heptaglucósido del ácido medicagénico.
En realizaciones particulares, los extractos de *Herniaria hirsuta* para su uso según lo previsto en el presente documento comprenden uno o más de quercetina-3-*O*-(2-*O*-rhamnosil)glucurónido, rutina e isorhamnetina-3-O-rutinósido. En otras realizaciones particulares, los extractos comprenden quercetina-3-*O*-(2-*O*-rhamnosil)glucurónido, rutina e isorhamnetina-3-O-rutinósido. En realizaciones particulares, los extractos de *Herniaria hirsuta* para su uso según lo previsto en el presente documento se caracterizan por tener una composición como se detalla en la Tabla 1 del presente documento. En otras realizaciones particulares, los extractos se caracterizan por un perfil de HPLC como se proporciona en la Figura 1 en el presente documento.

Los extractos normalizados de *Herniaria hirsuta* para su uso como se ha definido anteriormente se caracterizan por que la cantidad total de saponinas está entre 5 % y 18 %, y que están presentes flavonoides, en donde la cantidad total de flavonoides está entre 0,5 % y 7 %. En realizaciones particulares, la cantidad total de saponinas es de aproximadamente 9-13 %. De hecho, se ha encontrado que tales extractos son particularmente adecuados para asegurar los efectos terapéuticos descritos en el presente documento. En realizaciones particulares, la cantidad total de flavonoides es aproximadamente del 0,5 %. En otras realizaciones particulares, la cantidad total de flavonoides puede estar entre 2-7 %.

Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes para los expertos en la materia como resultado de los siguientes ejemplos que pretenden ser ilustrativos de la invención y no limitativos.

Ejemplos

1. Preparación de un extracto de material vegetal de *Herniaria hirsuta*

Para la preparación de un extracto normalizado se recolectaron las partes aéreas de *Herniaria hirsuta* (Oujda, Marruecos). El material se secó al aire. El extracto se preparó por infusión de 80 g del material vegetal seco en 4 l de agua hervida durante 30 minutos con agitación continua. Después de la filtración, la infusión se liofilizó.

Por lo general, 100 g de material vegetal produjeron aproximadamente 15 g de liofilizado.

La cuantificación del extracto seco se realizó mediante el método descrito a continuación.

2. Desarrollo de un método de HPLC para la determinación simultánea de saponinas y flavonoides en extractos de *Herniaria hirsuta*

Se desarrolló un método para el control de calidad del extracto normalizado mediante la determinación simultánea de saponinas y flavonoides. El método fue el siguiente: se pesaron con precisión 100 mg del extracto liofilizado en un matraz calibrado de 25,0 ml, lleno con metanol (Fisher Scientific, Hampton, NH, EE. UU.) 50 % (v/v) y ultrasonidos durante 20 min. Después de enfriarse, las soluciones de muestra resultantes se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm (Grace, Deerfield, EE. UU.). Para el posterior análisis de HPLC, se inyectaron 50 µl de la solución de muestra en una columna Apollo C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) (Grace, Deerfield, EE. UU.). Se eligió un caudal de 1 ml/min y se utilizó el siguiente gradiente: fase móvil A = H_2O + 0,05 % FA (Acros, Geel, Bélgica), B = metanol (Fisher Scientific, Hampton, NH, EE. UU.) + 0,05 % FA (Acros, Geel, Bélgica); gradiente: comenzar al 5 % B - permanecer al 5 % B durante 5 minutos - de 5 % a 100 % B en 55 minutos - permanecer al 100 % durante 2 minutos - de 100 % a 5 % B en 1 minuto - permanecer al 5 % B durante 2 min.

Se proporciona una ejecución ejemplar en la Figura 1.

El contenido de flavonoides se determinó usando rutina (Extrasynthese, Genay Cedex, Francia y Sigma, Bornem, Bélgica) como patrón externo, mientras que el contenido de saponina se expresó como α-hederacósido C (Extrasynthese, Genay Cedex, Francia y Roth, Karlsruhe, Alemania).

El método fue validado de acuerdo con las directrices de ICH. Se investigaron el modelo de calibración, intervalo, linealidad, precisión, exactitud y especificidad.

Se investigó el modelo de calibración de los dos patrones seleccionados. Por lo tanto, se prepararon cinco niveles de concentración tanto de rutina (1,28-489,50 µg/ml) (Extrasynthese, Genay Cedex, Francia y Sigma, Bornem, Bélgica) como de α-hederacósido C (19,52-780,61 µg/ml) (Extrasynthese, Genay Cedex, Francia y Roth, Karlsruhe, Alemania). Todas las soluciones se analizaron dos veces. Se construyó la línea de regresión, se generó la ecuación y se calculó el coeficiente de correlación. La pendiente y la intersección se investigaron con un ensayo t de Student. Los residuos se evaluaron gráficamente. También se realizó un ensayo de falta de ajuste ANOVA.

Para la repetibilidad de la inyección, una muestra se analizó 6 veces (precisión del sistema). También se investigaron

la precisión del método, es decir, la repetibilidad y la precisión intermedia. Por lo tanto, seis muestras preparadas independientemente (100 %; 100 mg) se analizaron de acuerdo con el método descrito anteriormente. El procedimiento se repitió en tres días diferentes y a tres niveles de concentración (50 %-100 %-150 %). Una solución de ambos patrones, utilizada para determinar la cantidad de flavonoides y saponinas se preparó nueva cada día y se analizó dos veces, usando el mismo método de HPLC. La media, la desviación típica y la desviación típica relativa (% RSD) se calcularon para cada día y cada nivel de concentración. La media global, la desviación típica global y el % de RSD global se calcularon para los tres días y también para los tres niveles de concentración diferentes. Esto se hizo para los flavonoides y saponinas individuales y para sus cantidades totales. La repetibilidad y la precisión intermedia se evaluaron mediante un ensayo ANOVA de factor único. Para la repetibilidad, se usaron los mínimos cuadrados internos para calcular la desviación típica y el % de RSD. Para la precisión intermedia, la desviación típica se calculó utilizando la siguiente fórmula: ((MSintercalado - MSinterno)/n + MSinterno) ^ 0,5). Antes de realizar el ANOVA de factor único, se realizó un ensayo de Cochran.

Para investigar la precisión del método, se realizó un experimento de recuperación. Al 50 % de la infusión de *H. hirsuta* una cantidad conocida de rutina (Extrasynthese, Genay Cedex, Francia y Sigma, Bornem, Bélgica) o α-hederacósido C (Extrasynthese, Genay Cedex, Francia y Roth, Karlsruhe, Alemania) se añadió hasta una concentración total del 100 % de cualquiera de las rutinas (Extrasynthese, Genay Cedex, Francia y Sigma, Bornem, Bélgica) o las saponinas. Para ambos compuestos. Las muestras se prepararon por triplicado de acuerdo con el procedimiento descrito.

En la Tabla 1 a continuación se proporciona una descripción general de la cantidad de flavonoides y la cantidad de saponinas presentes en el extracto obtenido.

Compuesto	Identificación	concentración	Peso molecular
1	Derivado del ácido cafeico	No cuantificado	No determinado
2	quercetina-3-*O*-(2-*O*-rhamnosil)glucurónido	2,03 %	624
3	Flavonoide	0,26 %	No determinado
4	Flavonoide	0,37 %	No determinado
5	Rutina	0,93 %	610
6	Isorhamnetina-3-*O*-rutinósido	0,67 %	624
7	Saponina: heptaglucósido del ácido hidroximedicagénico	3,2 %	1558
8	Saponina	1,4 %	1104
9	Saponina: heptaglucósido de ácido medicagénico	7,7 %	1542

La concentración de la cantidad total de flavonoides y saponinas en el extracto se determinó como 4,3 % ± 1,85 % y 12,28 % ± 5,83 % (media ± RSD%), respectivamente.

3. **Evaluación *in vivo* del efecto terapéutico del extracto de *Herniaria hirsuta***

3.1. Protocolo experimental para la evaluación *in vivo*

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Rabat, Marruecos. Se utilizaron 21 perros (14,5 ± 4,9 kg) para el experimento; la temperatura en el animalario osciló entre 16 y 35 ºC en un ciclo natural de luz y oscuridad. Los perros utilizados en el experimento se dividieron en un grupo de perros de control (CG, siete perros), un grupo de perros tratados con UDCA (UG, siete perros) y un grupo de perros tratados con un extracto de *H. hirsuta* obtenido en el Ejemplo 2 (HG, siete perros). Cada perro fue enjaulado individualmente y fue sometido a un periodo de aclimatación de 15 días en el nuevo entorno antes de comenzar el experimento. Durante este periodo, todos los perros recibieron un tratamiento antiparasitario. Posteriormente, todos los perros fueron alimentados diariamente con 200 g de carne de caballo que contenía 50 % de grasa de oveja durante 120 días, después de lo cual todos los perros fueron alimentados diariamente con 200 g de carne de caballo sin grasa de oveja hasta el final del experimento (día 180). En el día 30 del experimento comenzó el tratamiento de los diferentes grupos. Mientras que los perros CG no recibieron tratamiento adicional, los perros UG recibieron dos veces al día una dosis de 7,35 mg/kg de peso corporal UDCA y los perros HG recibieron dos veces al día una dosis de 48,5 mg/kg de peso corporal del extracto de hierbas (basado en Settaf et al. 2000) hasta el final del experimento (día 180). UDCA o el extracto de hierbas se mezclaron con una pequeña cantidad de carne asegurándose de que se administrara la dosis de tratamiento completa a cada perro. Se recogió una muestra de bilis y sangre de cada perro cada 30 días, después de lo cual se determinó la concentración de colesterol. Para la recogida de la bilis se utilizó el siguiente método quirúrgico: Todos los perros recibieron marbofloxacina al 2 % (1 mg/kg de peso corporal), acepromacina (0,05 mg/kg de peso corporal, IM), atropina (0,04 mg/kg de peso corporal, IM) y ácido tolfenámico (4 mg/kg de peso corporal, IM) antes de la cirugía. La inducción de la anestesia se realizó según el peso de los perros con tiopental sódico (15 mg/kg de peso corporal, IV) o xilazina (0,5 mg/kg de peso corporal, IV) combinada con ketamina (15 mg/kg de peso corporal, IV). Para el mantenimiento de la sedación se usó isoflurano (1 l/min) (xilazina, ketamina). Durante la cirugía, todos los perros recibieron respiración artificial a través de un tubo traqueal. Cada cirugía biliar se recogió perforando la vesícula biliar. Las muestras de bilis y sangre se almacenaron inmediatamente a -20 ºC, después de lo cual se realizó la cuantificación

del colesterol tanto en la bilis como en la sangre mediante un método enzimático (DiaSys Cholesterol FS).

Después de cada procedimiento quirúrgico, cada perro recibió marbofloxacina al *2* % (1 mg/kg de peso corporal) durante 4 días. El peso corporal de todos los perros se controló durante todo el experimento.

3.2. Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media ± EEM. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido del ensayo de Bonferroni o el análisis de Kruskal-Wallis y Dunnett T3. Un valor de $P < 0,05$ se consideró significativo.

3.3. Ensayo de Ames

Se realizó un ensayo de Ames de acuerdo con las directrices de la OCDE (Abdillahi et al., 2012). El extracto normalizado se ensayó en 5 cepas de *Salmonella typhimurium* (TA 1535, TA 100, TA 98, TA 1537, TA 102), incluso en presencia de metabolización de la fracción S9. Se ensayaron seis concentraciones del extracto (5 mg/placa, 1,5 mg/placa, 0,5 mg/placa, 0,15 mg/placa, 0,05 mg/placa, 0,015 mg/placa) y dependiendo de la cepa bacteriana y la ausencia y presencia de la fracción S9, se incluyeron diferentes controles positivos en el ensayo. Los controles positivos respectivos para TA 1535 fueron azida de sodio (50 µg/ml) y 2-aminoantraceno (25 µg/ml), para TA 100 azida sódica (50 µg/ml) y 2-aminoantraceno (10 µg/ml), para TA 98 4-nitroquinolina-1-óxido (2 µg/ml) y 2-aminoantraceno (25 µg/ml), para TA 1537 9-aminoacridina (500 µg/ml) en ambas situaciones y para TA 102 4-nitroquinolina-1-óxido (10 µg/ml) y 2-aminoantraceno (25 µg/ml). Cada concentración se ensayó por triplicado, mientras que los controles negativos se realizaron por cuadruplicado. Los resultados se expresan como el número medio de revertantes ± SEM.

3.4. Resultados

El nivel de colesterol en la bilis se determinó para todos los perros a partir del día 30 del experimento y con intervalos de tiempo de 30 días y se representa en la Figura 2A. Se observó que el grupo de control (CG) y el grupo que recibió UDCA (UG) mostraron un aumento en el colesterol biliar con el tiempo, hasta el día 120 (90 días de tratamiento) cuando se detuvo la dieta rica en colesterol. Sin embargo, los valores de colesterol biliar del grupo que recibió el extracto normalizado de *H. hirsuta* permaneció en los niveles iniciales a pesar de la administración continua de una dieta rica en colesterol. Aunque se observó una diferencia menor ($p \leq 0.05$) entre CG y HG después de 30 días de tratamiento con el extracto, Esta diferencia entre CG y HG fue más profunda después de 90 días de tratamiento ($p \leq 0,001$). Incluso 30 días después de la interrupción de la dieta rica en colesterol, se mantuvo una diferencia significativa ($p \leq 0,001$) entre el grupo no tratado y el grupo que recibió el extracto normalizado de *Herniaria hirsuta.* A los 150 días de tratamiento se pudo observar una gran desviación típica en CG, debido a los valores de colesterol biliar de un perro. Sin embargo, dado que este valor no se marcó como un valor atípico extremo por análisis estadístico, no se excluyó. De igual forma, la eliminación de este valor no causó ninguna diferencia profunda en los resultados estadísticos después de 150 días de tratamiento, ya que los tres grupos permanecieron estadísticamente iguales. No se pudo observar en ningún punto de tiempo una diferencia estadística entre CG y UG.

La disminución en los valores de colesterol en sangre se representa en la Figura 2B. Aquí también se observó una tendencia a disminuir con el tiempo, aunque menos significativa. No se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa para CG y UG entre los diferentes puntos de tiempo. Para HG se pudo observar una diferencia que comenzó después de 90 días de tratamiento con el extracto normalizado y permaneció hasta el final del experimento. A pesar de esta diferencia con el tiempo, los tres grupos (CG, UG y HG) permanecieron estadísticamente iguales para los valores de colesterol en sangre en los diferentes puntos de tiempo. En cuanto al peso corporal de los perros, todos los grupos fueron estadísticamente iguales y los perros no ganaron o perdieron peso corporal con el tiempo.

Los resultados obtenidos para el ensayo de Ames no mostraron una relación dosis-respuesta o una duplicación de la cantidad de revertantes en comparación con el control negativo.

Conclusión

Para demostrar el efecto de un extracto normalizado que contiene una cantidad definida de flavonoides y saponinas como componentes principales en el tratamiento y prevención de cálculos biliares, los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo en condiciones de dieta alta en grasas, que aumentan el nivel de colesterol biliar y favorecen la formación de lodo biliar y cálculos biliares. Está demostrado que incluso en condiciones tan desfavorables y poco saludables, el extracto normalizado de Hh evitará el aumento del colesterol biliar y, por lo tanto, evitará la formación de lodo biliar y cálculos biliares.

Esto está en contraste con los extractos de *Herniaria* previos, que solo han demostrado disminuir el colesterol biliar en un 28-30 %, similar al efecto UDCA (Settaf et al., 2000, Biologie & Santé 1(1), 44-49) en condiciones normales de dieta. Este porcentaje de disminución en condiciones normales de dieta no puede implicar que el efecto declarado se producirá en una dieta tan alta en grasas y en condiciones desfavorables.

Un uso prolongado de un extracto normalizado *Herniaria hirsuta* produce un efecto reductor del colesterol en la bilis pero no en la sangre de los perros cuando se mantiene una dieta rica en colesterol. Dado que este efecto farmacológico previene la formación de cálculos biliares y puede contribuir a resolver los cálculos biliares existentes, una preparación normalizada de *H. hirsuta* puede tener un efecto positivo en el tratamiento de los cálculos biliares en pacientes humanos.

REIVINDICACIONES

1. Un extracto de *Herniaria hirsuta* que comprende uno o más flavonoides de *Herniaria hirsuta* y una o más saponinas de *Herniaria hirsuta* para su uso en la prevención y/o tratamiento de colelitiasis o coledocolitiasis, **caracterizado por que** es un extracto normalizado de *Herniaria hirsuta* que comprende uno o más flavonoides de *Herniaria hirsuta* y una o más saponinas de *Herniaria hirsuta* y por que la cantidad total de flavonoides está entre 0,5 % y 7 % y la cantidad total de saponinas está entre 5 % y 18 %.

2. El extracto de *Herniaria hirsuta* para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicho extracto se administra a una dosificación que asegura la administración entre 3,6 mg y 8,4 mg/kg de peso corporal de saponinas *Herniaria hirsuta* por día.

3. El extracto de *Herniaria hirsuta* para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha prevención y/o tratamiento es un método para reducir el colesterol biliar.

4. El extracto de *Herniaria hirsuta* para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** el extracto normalizado de *Herniaria hirsuta* comprende uno o más de heptaglucósido de ácido hidroxidimedicagénico y heptaglucósido de ácido medicagénico.

5. El extracto de Herniaria hirsuta para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** los flavonoides de *Herniaria hirsuta* comprendidos en el mismo incluyen uno o más de quercetina-3-*O*-(2-*O*-rhamnosil) glucurónido, rutina e isorhamnetina-3-O-rutinósido.

6. El extracto de *Herniaria hirsuta* para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha prevención y/o tratamiento comprende la administración de dicho extracto a un paciente que lo necesite a una dosificación entre 0,5 g/día y 10,0 g/día.

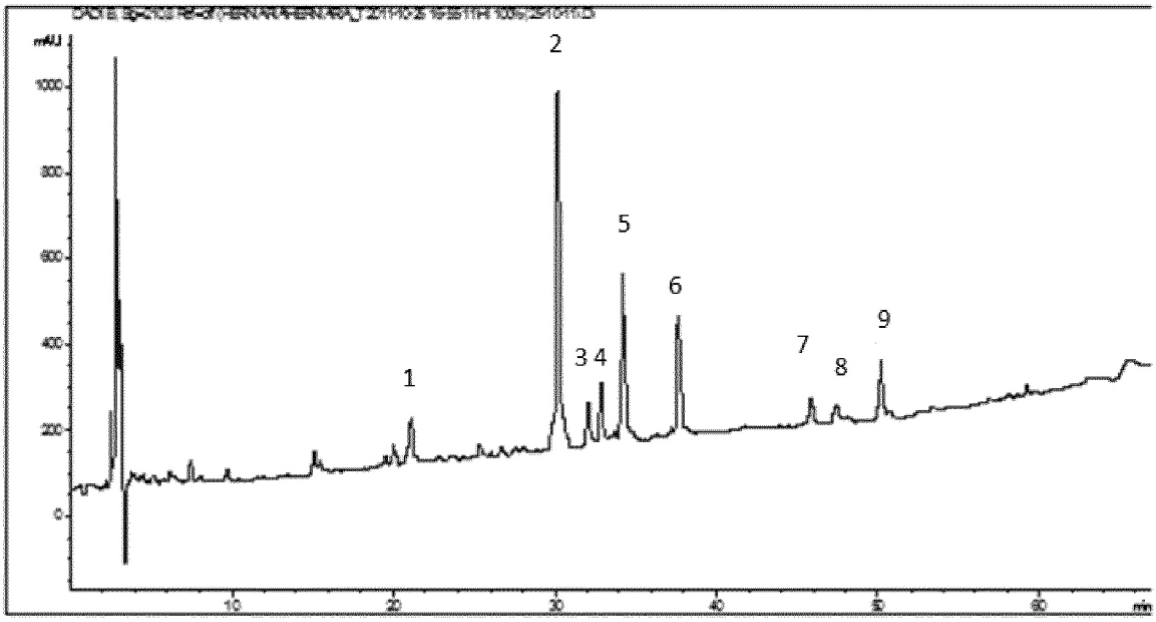
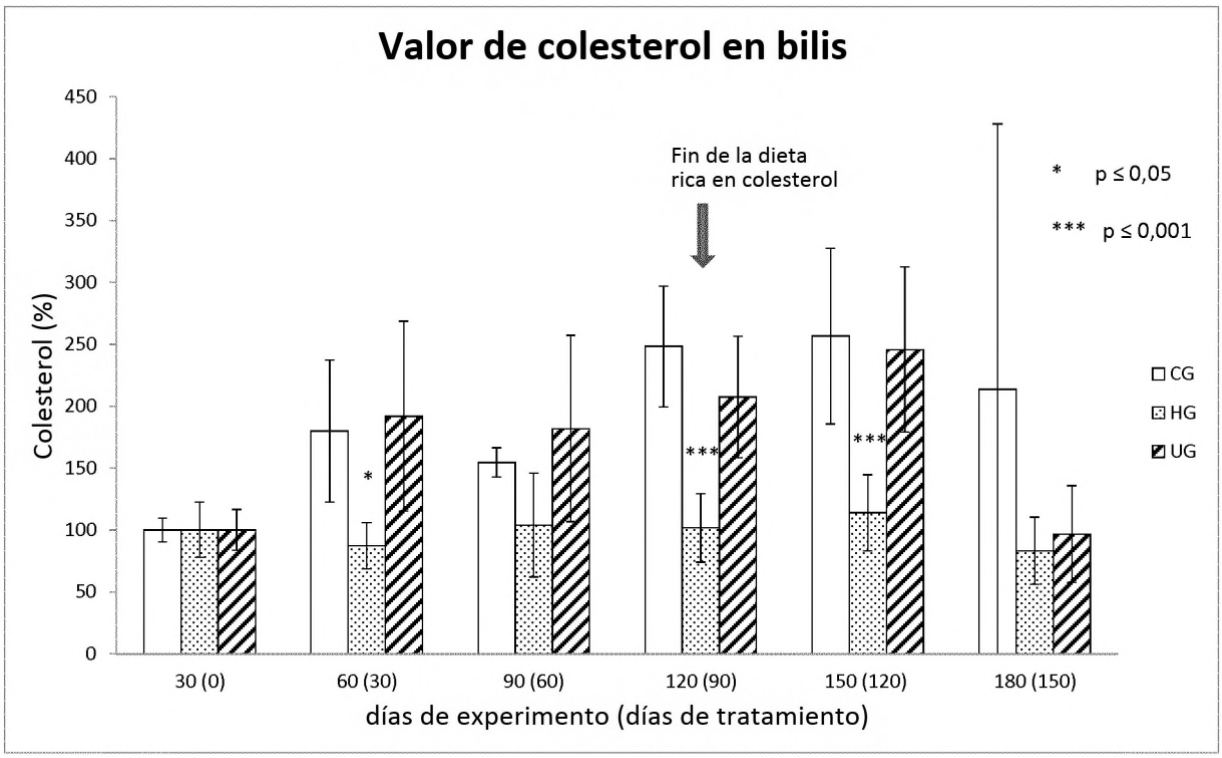


Figura 1

A


Valor de colesterol en bilis
Colesterol (%)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Fin de la dieta
rica en colesterol
* p ≤ 0,05
*** p ≤ 0,001
CG
HG
UG
30 (0)
60 (30)
90 (60)
120 (90)
150 (120)
180 (150)
días de experimento (días de tratamiento)

B

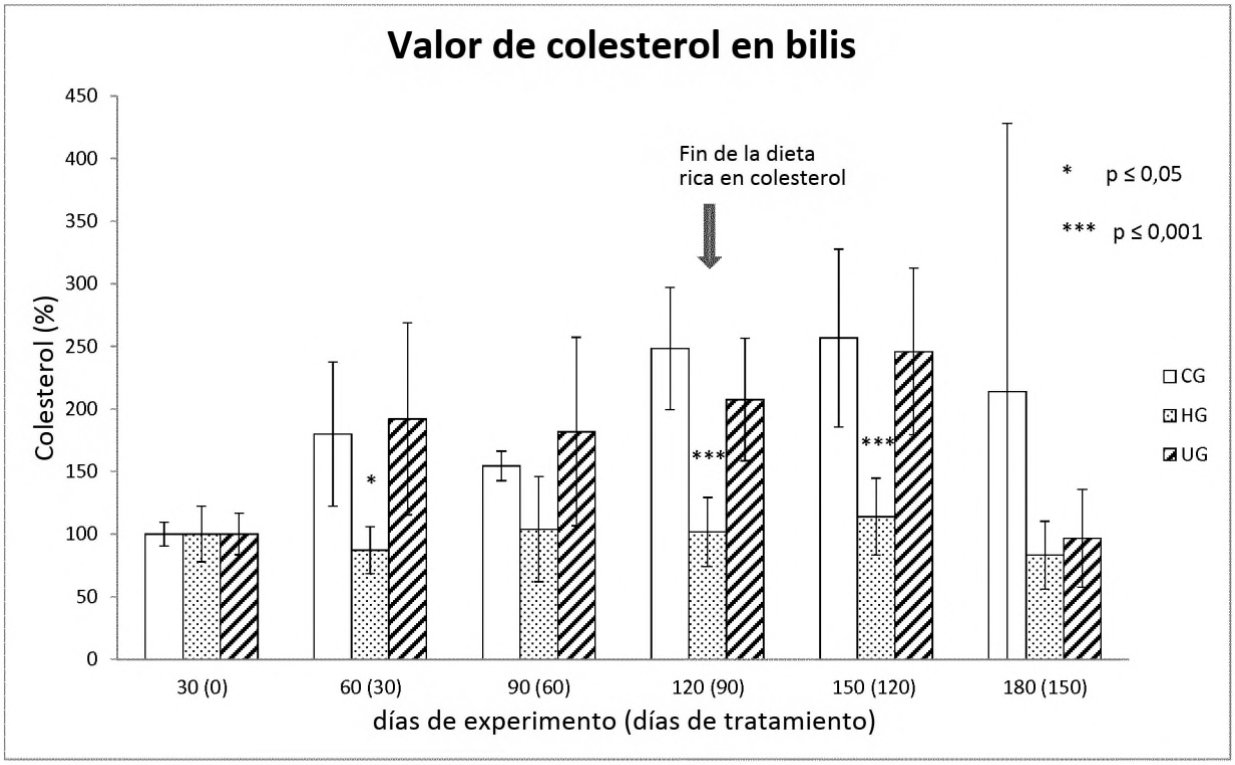

Valor de colesterol en bilis
Colesterol (%)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Fin de la dieta
rica en colesterol
* p ≤ 0,05
*** p ≤ 0,001
CG
HG
UG
30 (0)
60 (30)
90 (60)
120 (90)
150 (120)
180 (150)
días de experimento (días de tratamiento)

Figura 2