

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 901**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 36/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2010 PCT/EP2010/065795**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO11048144**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2010 E 10773277 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 2490667**

54 Título: **Composición que comprende Solanum Glaucophyllum para prevenir y/o tratar la hipocalcemia y para estabilizar los niveles de calcio en sangre**

30 Prioridad:

20.10.2009 CH 16112009

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

12.08.2020

73 Titular/es:

**HERBONIS AG (100.0%)
Rheinstrasse 30
4302 Augst, CH**

72 Inventor/es:

**BACHMANN, HEINRICH y
RAMBECK, WALTER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 778 901 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 que comprende *Solanum Glaucophyllum* para prevenir y/o tratar la hipocalcemia y para estabilizar los niveles de calcio en sangre

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica y/o veterinaria que comprende un preparado de *Solanum glaucophyllum*, a métodos para tratar y/o prevenir la fiebre de la leche.

Técnica anterior y el problema subyacente a la invención

10 En un aspecto general, la presente invención aborda los problemas de hipocalcemia y niveles de calcio en sangre subóptimas en humanos y animales, en particular en animales de sangre caliente y en ganado. El calcio juega un papel fundamental para la formación ósea, pero también para la función de la musculatura y el sistema nervioso. Debido a este importante papel, la concentración de calcio en sangre está regulada estrictamente en humanos y animales de sangre caliente (endotermos). Esta regulación se conoce como homeostasis de calcio. Los niveles de calcio en sangre aumentados (hipercalcemia) pueden provocar convulsiones, mientras que niveles de calcio demasiado bajos pueden provocar parálisis de extremidades y más tarde del músculo cardíaco. Cuando no se trata, esto puede provocar la muerte.

15 Por ejemplo en el ganado hembra, los valores de calcio en sangre generalmente caen fuertemente alrededor del parto por el comienzo repentino de producción de leche, que elimina el calcio de la circulación sanguínea materna. Este calcio no puede reemplazarse siempre suficientemente rápido a partir de la comida y de los huesos. Como consecuencia, especialmente las vacas mayores y altamente productoras de leche pueden padecer fiebre de la leche. La fiebre de la leche, hipocalcemia del periparto o paresia puerperal es una enfermedad del ganado productor de leche, tal como vacas, ovejas y cabras, en particular vacas lecheras, y es la más común en los primeros días de lactancia. Si la concentración de calcio en sangre cae por debajo de 1,6 mmoles/l, la vaca puede enfermar. Los individuos afectados generalmente padecen debilidad general (paresia), pérdida de apetito, parálisis y en el peor caso, muerte, generalmente debido a fallo cardíaco. La fiebre de la leche clínicamente manifiesta puede tratarse solo mediante inyección de una disolución de calcio. Sin embargo, también la hipocalcemia sub-clínica está asociada con enfermedades de seguimiento o secundarias, tales como mastitis, cetosis, *dislocatio abomasí*, parto traumático, y *retention secundinarum*. Como queda claro por lo anterior, la ocurrencia de hipocalcemia en animales productores de leche, en particular ganado se asocia con costes adicionales y tiene por consiguiente un impacto económico importante.

20 Se han propuesto varios tratamientos y profilaxis para abordar la hipocalcemia, en particular la hipocalcemia posparto, tal como fiebre de la leche en vacas.

25 Una posibilidad es la administración de 1,25-dihidroxitamina D₃ (1,25-(OH)₂ vitamina D₃) obtenida mediante producción sintética, por ejemplo. Esta forma hormonalmente activa de vitamina D₃, también conocida como calcitriol, es parte del mecanismo de regulación de los niveles de calcio en sangre y se produce en los riñones. La regulación fisiológica y producción de esta hormona es relativamente lenta y puede no ser suficiente bajo ciertas condiciones, en particular durante el comienzo de la producción de leche en los mamíferos. 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ induce un aumento de niveles del calcio en sangre aumentando la absorción de calcio del intestino, disminuyendo la transferencia de calcio de la sangre a la orina mediante el riñón y aumentando la liberación de calcio del hueso a la sangre. Sin embargo, a la administración de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ no le faltan problemas. Un problema es que puede ser contraproducente debido a su función reguladora homeostática en el cuerpo, cuando se administra demasiado pronto.

30 En una publicación de Horst et al. (Recurring hypocalcemia of bovine parturient paresis is associated with failure to produce 1,25-dihydroxyvitamin D. Goff JP, Reinhardt TA, Horst RL. Endocrinology. Julio de 1989; 125(1):49-53) los autores se dieron cuenta de una ventana de tiempo muy estrecha para la administración de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ para obtener un resultado beneficioso. Sin embargo, como el día o momento exacto del parto no puede predecirse con certeza, existe el riesgo de que el estrecho marco temporal se olvide cuando se administra 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ y se obtenga el efecto contraproducente mencionado anteriormente. Por lo tanto, sería ventajoso tener un marco temporal mayor para administrar 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ a una vaca antes del parto, para así aumentar la posibilidad de prevención y/o tratamiento exitoso de la fiebre de la leche y/o para mantener los niveles de calcio en sangre antes y después del parto. Además, sería ventajoso por supuesto administrar un medicamento solo una vez y no varias veces antes y/o después del parto.

35 Un problema importante de la administración de la 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ es la estrecha relación conocida entre el efecto deseado y los efectos secundarios indeseados. Este problema se describe en más detalle en el documento WO2009/129818.

40 Otra posibilidad para prevenir la hipocalcemia, en particular la hipocalcemia posparto es la administración de calcio directamente. Por ejemplo, Bovikalk® es un preparado de calcio disponible comercialmente en forma de un bolo para prevenir y tratar la fiebre de la leche en vacas. Este producto comprende calcio en forma de cloruro de calcio y sulfato de calcio y se disuelve en 30 minutos después de la administración. Una desventaja de este producto es la necesidad

de administración repetida. El bolo de Bovikalk® necesita administrarse oralmente antes y además varias veces después de que el parto sea efectivo. Ya que la administración de un bolo a una vaca necesita tiempo y esfuerzo, sería ventajoso tener un producto que necesite solo administrarse solo una vez. Otra desventaja de este producto está relacionada con la presencia de la forma ácida de calcio. Aunque el bolo tiene un recubrimiento basado en cera, hay informes de que el bolo se queda atascado en el esófago o se coloca de forma desventajosa en el primer estómago. Dependiendo de la posición del bolo en el tracto gastrointestinal del animal, los daños en la pared del esófago o el primer estómago e incluso perforación puede darse en algunos casos.

Una ventaja adicional de la administración directa de calcio es de nuevo que el periodo de tiempo para la necesaria administración antes del parto es relativamente corto. La administración demasiado temprana de calcio es contraproducente, debido al ajuste de la regulación corporal al exceso de calcio.

Otros métodos de tratamiento y prevención de la hipocalcemia en vacas incluyen el método DCAC, que es una dieta particular que reduce el pH en sangre y que es pobre en calcio y que se da a la vaca en las últimas semanas antes del parto. Aunque esta medida preventiva se considera efectiva, necesita un sistema de alimentación particular durante varias semanas. De forma similar, la adición de aglutinantes de calcio tales como zeolita o intercambiadores de iones similares a la comida necesita periodos de tratamiento de varias semanas antes del parto.

Además se ha propuesto la administración de ciertas plantas que contienen vitamina D₃, tal como *Solanum glaucophyllum*, *Cestrum diurnum* y/o *Trisetum flavescens*. Sin embargo, de nuevo son necesarias varias aplicaciones para dar con el momento ideal de administración antes del parto. Además, mediante la aplicación de materiales incontrolados (concentraciones, presencia de otros componentes vegetales), pueden darse efectos secundarios indeseados.

Haussler et al., en Life Sciences Pergamon Press, Oxford GB, vol. 18 (1976) páginas 1049-1056 meramente describe la extracción selectiva y posterior purificación de material vegetal de *Solanum malacoxycum* (*glaucophyllum*) para afirmar que "el principio tipo vitamina D en *Solanum malacoxycum* es un esteroles-glicósido que contiene la molécula de 1,25-(OH)₂ D₃ como su esteroles activo". No hay mención de ninguna aplicación específica de lo mismo.

Roux et al. en Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 1979, núm. 19 páginas 91-101 describen experimentos realizados con vacas al final de la gestación y se alimentaron con hojas molidas secas de *Solanum glaucophyllum* de 8 a 2 días antes del parto. Los autores notaron que "este tratamiento inhibió significativamente la caída de los niveles de calcio y fosfato asociados con el parto en vacas". Lo último, sin embargo, meramente hizo uso de material vegetal salvaje en donde el contenido en sustancia activa (metabolito biológicamente activo de vitamina D) ni se conoce exactamente ni se monitorizó, así que un riesgo de hipercalcemia incontrolada es real.

Kunz et al. en Berliner und Muenchner Tieraertzliche Wochenschrift, Vol. 94 (1981) páginas 421-424 describen experimentos donde las vacas se dosificaron oralmente con 10 o 20 g de *Solanum malacoxylon* (*glaucophyllum*) pulverizado seco durante un periodo de 5 o 6 días. Los animales probados se sacrificaron 19 a 31 días después de la última aplicación y sus sistemas circulatorios se examinaron por calcificaciones: 7 sobre 10 animales tenían gruesas calcificaciones en la aorta abdominal. Kunz et al. concluyeron que "la profilaxis de la paresia puerperal por aplicación de *Solanum malacoxylon* parece estar asociada con un riesgo considerable si el fármaco se administra al régimen elegido, especialmente en las mayores dosis".

Ninguno de los autores anteriores hacen uso de o simplemente sugiere el uso de extractos de hojas de *Solanum* en dicho contexto y, de forma más importante, si en la forma de formulaciones de liberación rápida o liberación retardada o incluso como combinaciones de las mismas.

En resumen, la presente invención aborda el problema de hipocalcemia en todos los animales dependientes de la vitamina D y en humanos y en particular de la fiebre de la leche en el ganado productor de leche, en particular vacas, ovejas y cabras. Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica y/o veterinaria efectiva que necesita solo administrarse una vez y que es adecuada para prevenir y/o tratar la hipocalcemia y en particular la fiebre de la leche. Además, es un objetivo proporcionar una composición que pueda administrarse en un marco temporal mayor antes de parir sin aumentar la ocurrencia de efectos contraproducentes. Además, es un objetivo evitar los efectos secundarios indeseados de productos actualmente comercializados, por ejemplo productos que contienen 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ sintética o cloruro de calcio, por ejemplo.

La presente invención aborda los problemas descritos anteriormente.

Compendio de la invención

Los inventores encontraron sorprendentemente que una composición que comprende un preparado de *Solanum glaucophyllum* (*S. glaucophyllum*) es adecuada para abordar los problemas subyacentes a la invención descrita anteriormente. En particular, el preparado de *S. glaucophyllum* comprende glicósidos de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃. Esta forma glicosídica de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ produce a un grado notablemente menor los efectos secundarios presentados por la 1,25-(OH)₂ vitamina D₃.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende dos

formulaciones de *S. glaucophyllum*. La composición es preferiblemente una composición farmacéutica y/o veterinaria.

5 Específicamente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica o veterinaria que comprende una primera formulación que comprende un preparado de *S. glaucophyllum* y una segunda formulación que comprende un preparado de *S. glaucophyllum*, en donde dicha primera formulación se caracteriza en que libera al menos un principio activo presente en dicho preparado más lentamente tras la administración que dicha segunda formulación. Preferiblemente, la composición comprende una fuente de calcio.

En otro aspecto, la invención se refiere a la composición de la invención para usar como un medicamento.

En un aspecto, la presente invención se refiere a la composición de la invención para tratar y/o prevenir y/o la fiebre de la leche, en particular en ganado.

10 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar y/o prevenir la paresia puerperal y/o la fiebre de la leche, por ejemplo paresia puerperal prenatal, comprendiendo el método la etapa de administración a un sujeto la composición de la invención.

Aspectos adicionales y realizaciones preferidas de la invención se definen en la presente memoria a continuación y en las reivindicaciones anexas. Las características adicionales y ventajas de la invención serán evidentes para el experto a partir de la descripción de las realizaciones preferidas dadas a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 compara la liberación *in vitro* de una formulación de liberación instantánea con una formulación de liberación retardada de acuerdo con la presente invención (comprimidos) cuando se añade a un medio de disolución (Farmacopea de EE.UU.). La liberación se monitoriza mediante medida en línea de absorción a 300 nm mediante un espectrofotómetro y se compara con la absorción medida cuando se añade un extracto seco de *S. glaucophyllum* directamente al agua.

La Figura 2 muestra la liberación *in vitro* de una formulación de liberación retardada de acuerdo con la presente invención (comprimidos) cuando se añade al medio de disolución. La liberación se determina midiendo la concentración de los 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos liberados en el agua repetidamente con el tiempo.

25 La Figura 3 muestra la evolución de la concentración en sangre de (1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos) en vacas no parturientas después de una única administración de un extracto de *S. glaucophyllum*. Se realizaron dos diferentes tratamientos, con la mitad de las vacas recibiendo 10 mg de extracto por kg de peso de animal y el otro grupo 20 mg/kg. Tres (3) de 4 vacas que habían recibido la misma dosis se agruparon y se muestran en la Figura 3 (triángulos: 20 mg/kg; círculos y cuadrados: 10 mg/kg). El rápido aumento de niveles de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ en sangre después de la administración puede verse.

La Figura 4 muestra niveles de calcio en suero de vacas después de la administración oral de diferentes tratamientos, concretamente: una formulación de liberación retardada según una realización de la invención que contiene un extracto de *S. glaucophyllum* con una cantidad determinada de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos (rombos, "liberación retardada"), el extracto seco directamente (círculos rellenos, "liberación instantánea"); una cantidad equivalente de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ sintética ("1,25(OH)2D3", *); y una composición que contiene una formulación de liberación retardada y una instantánea del extracto de *S. glaucophyllum* (triángulos rellenos, "combinación"). Los tratamientos que contienen la formulación de liberación retardada de acuerdo con la invención dieron por resultado la mayor concentración de calcio en suero durante el periodo completo. La línea inferior es el control (x).

La Figura 5 muestra niveles de fosfato en suero determinados en el mismo experimento como se describe para la Figura 4. La leyenda se muestra en la Figura.

La Figura 6 muestra los niveles de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ en suero determinados en el mismo experimento como se describe para la Figura 4. La leyenda se muestra en la Figura.

La Figura 7 muestra los niveles de calcio en suero en el tiempo antes (muestreo 1) de la primera administración en vacas que reciben de forma repetida una formulación de calcio disponible comercialmente (triángulos; Bc) en comparación con vacas que reciben una única dosis de administración de la composición de la presente invención (rombos rellenos). Se tomaron muestras a intervalos de dos días después del parto (muestréos 2-5). Como puede verse, una única administración de la composición de la invención tuvo un efecto más profundo en el calcio y fosfato en sangre que la administración repetida de la formulación de calcio disponible comercialmente.

La Figura 8 es como la Figura 7, pero mostrando los niveles de fosfato en suero. Los datos obtenidos en la base de la composición de la invención se muestran como rombos.

La Figura 9 es como las Figuras 7 y 8, pero mostrando los niveles de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ en suero. Los datos obtenidos en la base de la composición de la invención se muestran como rombos.

La Figura 10 muestra una realización de la composición de la presente invención, proporcionada en la forma de un

bolo experimental adaptado a las vacas. El bolo es adecuado para prevenir la fiebre de la leche en vacas gestantes si se administra en los 4 a 2 días antes del parto. El bolo está hecho de una cápsula de gelatina transparente y contiene comprimidos de liberación retardada (comprimidos grandes oscuros), comprimidos de liberación instantánea (comprimidos oscuros pequeños) y cápsulas de dolomita (comprimidos blancos alargados, grandes). Antes de la administración, el bolo puede estar lleno con excipiente.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente invención se refiere a una composición que comprende un preparado de *S. glaucophyllum*.

Un "preparado de *S. glaucophyllum*", para el propósito de la presente invención, puede ser cualquier preparado obtenido de la planta *Solanum glaucophyllum* que contiene glicósidos de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃. Preferiblemente, el preparado se obtiene de las hojas de *S. glaucophyllum*. Los 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos son el principio activo presente en *S. glaucophyllum*. La forma glicosídica de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ se supone que necesita la ruptura del enlace glicosídico en el tracto gastrointestinal, por ejemplo en el rumen de los rumiantes, antes de que pueda absorberse. El preparado de *S. glaucophyllum* puede denominarse en la presente memoria como el preparado vegetal.

La 1,25-dihidroxitamina D₃, también conocida como calcitriol y 1,25-dihidroxicolecalciferol, es la forma hormonalmente activa de vitamina D. En la presente invención a continuación, se usa cualquiera de estas designaciones y también la designación 1,25-(OH)₂ vitamina D₃.

Según una realización, el preparado de *S. glaucophyllum* se prepara a partir de hojas secas. Por ejemplo, las hojas secas pueden molerse, desmenuzarse o transformarse de cualquier otra forma en un polvo. El polvo puede usarse entonces directamente para la preparación de la composición de la invención.

Según una realización, dicho preparado de *S. glaucophyllum* se selecciona en particular del grupo hojas secas desmenuzadas y/o en polvo de *S. glaucophyllum*, un extracto preparado a partir de hojas de *S. glaucophyllum* y a partir de una combinación de ambos de los mencionados anteriormente.

De acuerdo con lo anterior, el preparado de *S. glaucophyllum* puede ser un extracto preparado de *S. glaucophyllum*, preferiblemente de material vegetal, tal como la planta entera, las partes aéreas de la planta, y/o las hojas. El material vegetal está preferiblemente seco. Puede prepararse un extracto como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2009/129818. En particular, un extracto puede obtenerse, por ejemplo, mediante maceración o mediante percolación, por ejemplo, usando un disolvente adecuado. Como un disolvente, puede usarse una mezcla de agua y un alcohol inferior (preferiblemente etanol) o acetona en la relación (v:v) en el intervalo de 80:20 a 25:75 (agua:alcohol/acetona), por ejemplo.

En un típico proceso de extracción, las hojas y la disolución disolvente se mezclan a una relación en peso de 1:5 a 1:15 (hojas:disolvente), por ejemplo, y el principio activo se extrae así agitando la mezcla durante aproximadamente 6 a 24 horas a 25 a 55°C, por ejemplo. El proceso puede repetirse después de la eliminación del disolvente, por ejemplo mediante filtración y añadiendo nuevo disolvente.

Según una realización, la percolación se usa para extraer los principios activos. En este caso, puede usarse cualquier equipo adecuado disponible comercialmente. Por ejemplo, el material vegetal puede percolarse en un percolador que comprende 1 a 10, preferiblemente 4 a 8 tanques conectados de forma cíclica, a 35-55°C durante 4 a 8 horas.

Uno o más antioxidantes pueden añadirse a 0,05 a 1% en peso, preferiblemente 0,05 a 0,2% en peso de materia seca al extracto vegetal, por ejemplo a la fase líquida después de la percolación. Son ejemplos el ácido ascórbico, galatos, BHA y BHT. Esto puede reducir el oscurecimiento indeseado de la fase líquida y del extracto. El oscurecimiento también puede reducirse, de forma alternativa o además, ajustando el pH de la fase líquida a un valor de 5,5 a 6,5 usando, preferiblemente, un ácido de grado alimentario, tal como ácido cítrico, ácido acético, ácido fórmico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, por ejemplo.

El disolvente de la fase o fases líquidas se reduce preferiblemente y/o se elimina al menos parcialmente, por secado, evaporación y/o al vacío, por ejemplo usando un evaporador de capa fina a una concentración de aproximadamente 10-50%, más preferiblemente 30-40%, lo más preferiblemente aproximadamente 35% de materia seca, para obtener un extracto líquido concentrado.

Este extracto líquido concentrado puede analizarse con respecto a la presencia de cualquier alcaloide indeseado. Por ejemplo, puede comprobarse si uno cualquiera o más de solanina, chaconina y/o solasodina pueden detectarse en el extracto. La solanina, tal como la α-solanina, es un veneno glicoalcaloide que puede estar presente en especies de la familia de la belladona (*Solanaceae*). La alfa-chaconina es un glicoalcaloide esteroideo, que tiene propiedades insecticidas y fungicidas. La solasodina también es un glicoalcaloide venenoso.

Si se detecta cualquiera de los alcaloides mencionados anteriormente, puede eliminarse guiando el extracto líquido concentrado sobre una columna adecuada, por ejemplo. Por ejemplo, el extracto líquido puede cromatografiarse usando una columna que comprende una resina de intercambio de iones fuertemente o débilmente ácida, que se equilibra preferiblemente en la forma H⁺. Este puede ser un proceso continuo o en lotes.

Según una realización, dicho preparado de *S. glaucophyllum* se caracteriza en que los glicósidos de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ son la única forma activa de vitamina D₃ presente en dicho preparado y/o en que los alcaloides que se dan a veces en la especie *Solanum* están esencialmente ausentes, siendo dichos alcaloides ausentes preferiblemente uno, dos o los tres seleccionados de solanina, chaconina y solasodina. “Esencialmente ausentes”, a este respecto, significa que dichos alcaloides pueden estar presentes por debajo del nivel de detección de los métodos de detección disponibles comercialmente. Preferiblemente, dichos alcaloides están totalmente ausentes en dicho preparado.

Además la concentración o contenido de los principios activos, 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos, en el extracto pueden determinarse en esta etapa. Estas concentraciones pueden variar entre plantas y dependiendo de las condiciones climáticas y/o sitio de cultivo y por tanto necesitan determinarse para así controlar la dosis.

El extracto líquido concentrado, o, si está guiado sobre una columna, el eluido del extracto líquido concentrado se trata entonces preferiblemente con calor, por ejemplo mediante tratamiento UHT, para así eliminar gérmenes.

Antes de la etapa de secado final, aditivos, excipientes, en particular carbohidratos y derivados de los mismos, tal como, por ejemplo, maltodextrina y similares pueden añadirse en cantidades adecuadas. De esta forma, la concentración del principio activo (1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos) puede ajustarse a un valor deseado. Pueden añadirse aditivos para mejorar o ajustar la estabilidad, procesabilidad y/o plasticidad, por ejemplo.

A partir de ahí, el extracto líquido concentrado puede secarse a un contenido en agua final de por debajo de 10%, preferiblemente por debajo de 7%, incluso más preferiblemente por debajo de 6%, lo más preferiblemente por debajo de 5%. Esto puede conseguirse mediante secado por pulverizado o cinta de vacío, por ejemplo.

El extracto seco anterior puede usarse directamente en la composición de la invención o puede procesarse más, por ejemplo para obtener una o más formulaciones que muestren características de liberación controlada. Por ejemplo, el extracto puede usarse directamente como una formulación de liberación instantánea. Según otro ejemplo, el extracto seco (o también el líquido concentrado) puede usarse para preparar formulaciones de liberación instantánea y/o retardada específicas.

Como se menciona anteriormente, las concentraciones de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ glicósidos en *S. glaucophyllum* pueden variar debido a diferentes factores, que como tal no todos pueden controlarse siempre. Por lo tanto, es ventajoso usar una clase o variedad de *S. glaucophyllum* que tenga generalmente un alto contenido de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos, en particular en las hojas. Según una realización preferida, dicho *S. glaucophyllum* se selecciona de un tipo salvaje o forma cultivada de *S. glaucophyllum*, preferiblemente de la raza vegetal “HERVIT” (según el certificado comunitario de variedades vegetales EU25473 del 22 de junio de 2009). Por supuesto, otras razas y/o variedades, tales como las que se derivan de dicha raza “HERVIT”, pueden tener un contenido incluso mayor de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos y pueden por consiguiente usarse también o preferiblemente.

Según una realización, la composición de la presente invención está prevista para administración oral.

Según una realización, la composición comprende al menos una, por ejemplo una primera formulación, que comprende dicho preparado de *S. glaucophyllum*, en donde dicha formulación libera el principio activo presente en la preparación de una manera de liberación retardada o lenta.

La liberación retardada o lenta significa preferiblemente que dicha formulación ha liberado completamente dicho principio activo no antes sino posiblemente después de un periodo que dura al menos 4 horas, al menos 6 horas, preferiblemente al menos 8 horas, más preferiblemente al menos 10 o al menos 12, 14, 16 horas, preferiblemente al menos 18 horas, más preferiblemente al menos 20 horas, y lo más preferiblemente no antes de la expiración de 22, preferiblemente 24 horas después de la administración de la composición. De acuerdo con la invención, el principio activo puede liberarse de forma constante aunque de una manera retardada en el tiempo y dicha liberación se completa, con respecto a la formulación de liberación retardada, no antes del tiempo indicado.

En otras palabras, la formulación de liberación retardada retiene y por consiguiente previene la liberación de al menos algo del principio activo durante un periodo de 4, 6, 8, 10, 12, 18, 20, 22, 24 horas.

Para el propósito de la presente memoria, las expresiones “liberación lenta”, “liberación con retardo”, “liberación retardada”, “liberación sostenida” y similares tienen el mismo significado. Generalmente, la expresión “liberación retardada” se usa para referirse a todas ellas.

La duración de la liberación o la duración de la retención de la liberación se refiere en principio a la liberación en el tracto gastrointestinal después de la administración. Para determinar la liberación en un entorno experimental controlado, un texto de liberación *in vitro* que usa un medio de disolución puede emplearse como una aproximación. La liberación de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos puede determinarse midiendo la absorbancia en el recipiente de prueba a 300 nm, en línea, por ejemplo, o determinando la concentración del principio activo presente en la disolución experimental en medidas repetidas en el tiempo (ambos experimentos se realizan en los ejemplos). Más específicamente, el tiempo de liberación se determina usando la actual prueba de disolución de la farmacopea de EE.UU. (USP), descrita en la USP, en particular el capítulo Disolución <711>. El medio de disolución se filtra (filtro de porosidad de 0,45 µm) y agua desaireada (procedimiento de desaireado de USP) y tiene una temperatura de 37°C al

principio de la prueba (véase: Dissolution Toolkit Procedures for Mechanical Calibration and Performance Verification Test Apparatus 1 and Apparatus 2 Versión 2.0, 22 de marzo de 2010).

Según una realización, dicha liberación retardada o dicha primera formulación comprende dicho preparado de *S. glaucophyllum* con al menos un excipiente, que muestra características de liberación retardada.

- 5 Según una realización, dichas características de liberación retardada se obtienen incluyendo dicho preparado de *S. glaucophyllum*, por ejemplo dicho extracto, en una matriz o recubriendo dicho preparado que contiene dicho extracto con un excipiente que libera dicho principio activo de una manera retardada. Según una realización, dicha matriz comprende componentes que no son o son apenas solubles en agua y/o en donde dicho excipiente de dicho recubrimiento libera dicho principio activo por difusión a través de dicho recubrimiento y/o por medio de descomposición enzimática en compartimientos específicos del tracto digestivo. Según una realización, la liberación puede darse debido a la erosión en presencia de agua y/o líquidos digestivos.

- 10 Hay muchas formas diferentes en que la liberación del principio activo puede retardarse de acuerdo con la invención y la invención no pretende estar limitada a una formulación de liberación retardada particular. Como se menciona, el preparado vegetal puede incrustarse en una matriz que contiene componentes y/o excipiente que previenen, entorpecen o ralentizan la disolución y/o erosión de la formulación una vez administrada. Los componentes que son solo parcialmente solubles o no solubles en agua pueden añadirse en la formulación. Un ejemplo de un excipiente que puede usarse para preparar la formulación de liberación retardada es Eudragit® RS o RL (copolímeros de ésteres de ácido acrílico o metacrílico con un bajo contenido en grupos de amonio cuaternario). Este copolímero puede usarse como un componente matriz, por ejemplo en comprimidos, o usarse como un recubrimiento. Más adelante, se proporcionan ejemplos de formulaciones de liberación retardada.

- 15 Según una realización, el recubrimiento de dicho preparado vegetal y/o de dicha formulación de liberación retardada comprende un excipiente, que es resistente al líquido digestivo del estómago, pero que se descompone cuando entra en contacto con la bilis y/o con jugo pancreático. Por ejemplo, pueden usarse grasas y otros ésteres de ácidos grasos en el recubrimiento para este fin.

- 20 Según una realización, la composición comprende al menos un preparado de *S. glaucophyllum* en forma de una formulación de liberación instantánea. La expresión "formulación de liberación instantánea" se refiere a cualquier formulación que no retarda específicamente la liberación y a formulaciones que contienen ingredientes que aceleran la liberación del principio activo contenido en la formulación. Para el propósito de la presente invención, una formulación de liberación instantánea incluye formulaciones de liberación normal y rápida. En una formulación de liberación instantánea de acuerdo con la presente invención, el principio activo se libera desde la formulación en un periodo de tiempo de 8 horas, preferiblemente en 6 horas, más preferiblemente en 5, 4, 3, 2 horas o incluso en 1 hora, por ejemplo después de la administración. Además en caso de la formulación de liberación instantánea, la medida de la duración de liberación completa puede determinarse mediante un experimento *in vitro* como se describe en otra parte en esta memoria.

- 25 El extracto seco, soluble, descrito anteriormente es fácilmente soluble en agua y puede por consiguiente usarse directamente como una formulación de liberación instantánea para el propósito de la presente invención. La formulación de liberación instantánea puede también comprender excipientes que aumentan o aceleran la liberación, tal como disgregantes, que pueden provocar el rápido hinchado y disgregación de la formulación, por ejemplo un comprimido o una píldora, que la comprende. Ejemplos de dichos disgregantes son sales de sodio de carboximetilcelulosa y almidón carboximetilado, polivinilpirrolidona reticulada (PVP) o simplemente almidón.

- 30 La formulación de liberación instantánea, y/o la formulación de liberación retardada puede, independientemente, además comprender materiales de unión y excipientes como es normal en la técnica.

- 35 Por supuesto, pueden añadirse aditivos adicionales para facilitar la producción de la formulación de liberación retardada y/o instantánea particular tal como el comprimido y/o el recubrimiento, tales como diluyentes, emolientes, plastificadores, antiadherentes, agentes antiaglutinantes, agentes humectantes y similares.

- 40 La composición de la invención comprende una primera formulación que comprende un preparado de *S. glaucophyllum* y una segunda formulación que comprende un preparado de *S. glaucophyllum*, en donde dicha primera formulación se caracteriza en que libera al menos un principio activo presente en dicho preparado más lentamente tras la administración que dicha segunda formulación. Por consiguiente, dicha primera formulación puede ser una formulación de liberación retardada y dicha segunda formulación puede ser una formulación de liberación instantánea como se trata en otra parte en esta memoria.

- 45 Según una realización, dicha segunda formulación comprende dicho preparado de *S. glaucophyllum* y uno o más excipientes, que libera rápidamente dicho principio activo. Por ejemplo, la liberación rápida puede darse después del contacto con agua y/o líquidos digestivos, por ejemplo en el primer estómago o rumen de los rumiantes o en el estómago de animales monogástricos.

50 La composición de la invención comprende una fuente de calcio.

Se prefieren las fuentes de calcio que tienen una alta biodisponibilidad. Específicamente, la fuente de calcio es dolomita. Más preferiblemente, la fuente de calcio es dolomita activada por calor. Esta forma de calcio tiene una biodisponibilidad sorprendentemente alta con una parte alta o incluso principal del calcio ingerido que se absorbe en el tracto gastrointestinal.

5 La dolomita y la dolomita activa por calor están disponibles comercialmente.

La dolomita es particularmente ventajosa porque proporciona calcio fácilmente absorbible, y, además, magnesio, que es beneficioso para el proceso de la contracción del músculo durante el trabajo del parto.

Además, la dolomita es adecuada para aumentar la densidad de la composición de la invención. Según una realización, la composición de la invención, y/o la primera formulación y/o la formulación de liberación retardada tienen una densidad de $\geq 1,1$, preferiblemente $\geq 1,15$ o $\geq 1,2$, o más preferiblemente $\geq 1,25$, incluso más preferiblemente $\geq 1,3$. La alta densidad es particularmente relevante para la formulación de liberación retardada, como se detalla a continuación.

10

Por consiguiente, la dolomita puede añadirse a o parte de la primera formulación, a la segunda formulación o ambas. De forma alternativa, la dolomita puede añadirse a la composición de forma separada.

15 La ventaja de tener una densidad ≥ 1 aplica en particular a rumiantes, que pueden por otro lado reprocesar y rumiar y por lo tanto destruir también físicamente la formulación de liberación retardada masticando, de manera que se pierden las características de liberación retardada. Sin embargo, si la densidad se ajusta, al menos de la formulación de liberación retardada, a los valores indicados, la respectiva formulación no se reprocesará sino que permanece en el rumen o tracto gastrointestinal y el principio activo se libera de una manera retardada cuando se desee.

20 La dolomita es por consiguiente un aditivo particularmente ventajoso en que añade calcio biodisponible, ayuda al trabajo del parto y aumenta la densidad de la formulación que lo contiene.

La composición puede proporcionarse en cualquier forma ingerible adecuada. Según una realización, la composición de la invención se proporciona en forma de cualquiera de una o más del grupo seleccionado de: un bolo, una cápsula, una composición granular, un granulado, un comprimido, un gel y un polvo, por ejemplo un polvo compactado.

25 Por ejemplo, la composición de la invención puede añadirse en forma de un polvo a la comida normal y tomarse con esta comida.

Según una realización, el preparado de *S. glaucophyllum* y/o formulaciones de liberación instantánea y/o retardada se proporcionan en forma de un gel.

30 Según una realización, las formulaciones y/o preparados se prensan de forma homogénea o se compartimentan en diferentes capas o están dispuestas de forma cilíndrica. En este último caso, la formulación de liberación retardada se proporciona preferiblemente en el centro del cilindro, por ejemplo en forma de un cilindro interno, proporcionando la formulación de liberación instantánea como un cilindro externo que encierra la formulación de liberación retardada, por ejemplo.

35 Si la composición se va a aplicar a un animal, por ejemplo una vaca, puede proporcionarse en forma de un bolo. Un bolo puede administrarse usando un aplicador de bolo disponible comercialmente. Los bolos se usan normalmente para la administración de suplementos dietéticos y medicamentos al ganado.

Según una realización, la composición se proporciona en forma de un bolo en capas, granulado o comprimido que comprende al menos dos capas, una capa que es o comprende la formulación de liberación instantánea y la otra capa que es o comprende la formulación de liberación retardada.

40 Según otra realización, las formulaciones se proporcionan en forma de comprimidos. Por ejemplo, la formulación de liberación instantánea puede proporcionarse en forma de comprimidos o cápsulas que son diferentes de los comprimidos de la formulación de liberación retardada. Cualquiera de las dos formulaciones puede comprender la fuente de calcio, en particular dolomita, o la fuente de calcio puede proporcionarse también en forma de comprimidos separados. Todos los comprimidos pueden rellenarse, por ejemplo, en una cápsula de bolo, opcionalmente llena con un excipiente o aglutinante, y administrada en esta forma al animal.

45

Las Tablas 1-3 posteriores muestran formulaciones de liberación instantánea ejemplares (Tabla 1) y formulaciones de liberación sostenida (Tablas 2 y 3), que se proporcionan en forma de comprimidos separados que contienen un extracto seco de *S. glaucophyllum* como se describe en los ejemplos y cualquier otra parte en esta memoria. Los nombres del producto ejemplar de ingredientes que pueden usarse para producir los comprimidos también se indican.

50 En algunas líneas de las tablas, por ejemplo con respecto a los disgregantes, productos diferentes que pueden usarse en la alternativa o en combinación se describen.

ES 2 778 901 T3

Tabla 1: Formulaciones ejemplares de comprimidos de liberación instantánea (comprimidos IR)

Densidad: 1,2-2 g/ml; diámetro: por ejemplo aproximadamente 8 mm			
Ingredientes	Peso comprimido	por	Función
1. extracto seco de <i>S. glaucophyllum</i>	50 mg		
2. dolomita CaMg[CO ₃] ₂	c.s.p.		- regulación de densidad
	aprox. 0-350 mg		- fuente de Mg y Ca
3. sal sódica de almidón carboximetilado (Explotab [®] , Vivastar [®] , Primojel [®]); 2-8%	8-32 mg		
Polivinilpirrolidona reticulada (Kollidon CL [®]); 0,5-5%	2-20 mg		
Sal sódica de carboximetilcelulosa (Ac-Di-Sol [®] , Vivasol [®]); 1-5%	4-20 mg		Disgregantes
almidón (Starch 1500); 2-10%	8-40 mg		
4. PVP; HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) 0-10%	0-40 mg		Aglutinantes
5. lactosa / celulosa microcristalina	0-170 mg (c.s.p.)		Excipientes
Total	aprox. 400 mg		

c.s.p.: como se considere útil

Tabla 2: Formulaciones ejemplares de comprimidos de liberación retardada (comprimidos SR), la matriz sola (el recubrimiento se describe más abajo). Conceptos ejemplares 1 y 3: los comprimidos pueden tener, por ejemplo diámetro de 8 mm y una densidad de >2 g/ml

Ingredientes	Peso por comprimido	Función
1. extracto seco de <i>S. glaucophyllum</i>	40-80 mg	
2. dolomita CaMg[CO ₃] ₂	c.s.p.	- regulación de densidad
	aprox. 280-340 mg	- Fuente de Mg y Ca
3. PVP; HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa)	0-20 mg	aglutinante
4. lactosa / celulosa microcristalina	0-60 mg (c.s.p.)	Excipiente
Total	aprox. 400 mg	

5

Tabla 3: Formulaciones ejemplares de comprimidos de liberación retardada (comprimidos SR), la matriz solo (el recubrimiento se describe más abajo). Concepto ejemplar 2: los comprimidos pueden tener, por ejemplo 3 mm de diámetro y una densidad de aproximadamente ≥1,2 g/ml.

Ingredientes	Peso por comprimido	Función
1. extracto seco de <i>S. glaucophyllum</i>	2 mg	
2. dolomita CaMg[CO ₃] ₂	c.s.p.	- regulación de densidad,
	aprox. 1-3 mg	- Fuente de Mg and Ca
3. PVP; HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa)	0-1 mg	Aglutinante
4. lactosa / celulosa microcristalina	6-9 mg (c.s.p.)	Excipiente
Total	aprox. 12 mg	

10 Los comprimidos descritos en las Tablas 2 y 3 están recubiertos preferiblemente para retardar la liberación de los 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos.

De acuerdo con los conceptos 1 y 3 (Tabla 2), el recubrimiento puede comprender o estar compuesto de, por ejemplo poli(met)acrilato-metilo/etilo/2-trimetilaminoetiléster-copolimerizado (Eudragit[®] RL, Eudragit[®] RS) con HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa), lactosa o polivinil-lactato para proporcionar poros para el ajuste de la velocidad de

liberación en los conceptos 1 y 2, además de antiadherentes (por ejemplo talco), agente humectante (por ejemplo Tween® 80) y plastificadores (ejemplos: ftalato de dietilo, citrato de trietilo).

5 De acuerdo con el concepto 2 anterior (Tabla 3), la formulación puede procesarse a comprimidos o cápsulas. Si se procesa a comprimidos, pueden estar recubiertas, por ejemplo, con polimetacrilato-metilo/butilo/2-dimetil aminoetil éster-copolimerizado (Eudragit® E) con agentes humectantes adecuados (por ejemplo laurilsulfato sódico), plastificadores (ácido esteárico) y agentes anti-apelmazantes (por ejemplo talco).

Si se procesa a cápsulas, el recubrimiento puede comprender y/o estar compuesto de etilcelulosa (Aquacoat®, Surelease®) con plastificador (ejemplos: ftalato de dietilo, citrato de trietilo), agentes humectantes (por ejemplo Tween® 80) y agentes anti-apelmazantes (por ejemplo talco), si fuera necesario.

10 Como se menciona a continuación, la composición de la invención puede comprender una formulación de liberación retardada y una formulación de liberación instantánea. Preferiblemente, las dos formulaciones están contenidas en la composición a una relación en peso de 1:9 a 9:1, 2:8 a 8:2, 3:7 a 7:3, 4:6 a 6:4 y preferiblemente aproximadamente 1:1, expresado como relación en peso de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos presentes en la formulación de liberación instantánea con respecto a la formulación de liberación retardada.

15 Con el objetivo de mantener la dosis administrada de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos constante, los siguientes ejemplos que usan los comprimidos/cápsulas de los conceptos 1 a 3 anteriores se dan, en que la dosis total se mantiene a 10 g por extracto vegetal seco.

Concepto 1: IR: 4 g; SR: 6 g; => 80 comprimidos IR y 100 comprimidos SR.

Concepto 3: IR: 4 g; SR: 6 g; => 80 comprimidos IR y 100 comprimidos SR.

20 Concepto 2: IR: 6 g; SR: 4 g; => 120 comprimidos IR y 2000 comprimidos SR.

Los ejemplos anteriores ilustran como el experto puede controlar la cantidad de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósido que se administra en una formulación de liberación retardada y/o en una liberación instantánea. Se anota, que la concentración de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos en el extracto vegetal seco se controla y/o ajusta antes de la etapa de secado final como se describe en otra parte en esta memoria.

25 La composición y/o formulaciones descritas en esta memoria pueden usarse como medicamentos y en métodos de prevención y/o tratamiento de condiciones, tales como enfermedades.

30 Las composiciones pueden usarse en particular para prevenir los niveles de calcio en sangre sub-óptimos, para aumentar los niveles de calcio en sangre, para evitar y/o prevenir la deficiencia en calcio, para mantener niveles sanos, promedio y/o normales de calcio en sangre, en particular en ganado (en particular en vacas, cabras y ovejas) y además en humanos.

La expresión "niveles de calcio en suero" y similares se refiere preferiblemente al contenido total de calcio en sangre, incluyendo calcio disuelto libre además de unido a proteína, como puede determinarse, por ejemplo, después de la recogida del calcio total de una muestra de sangre, mediante fotometría de llama.

35 Por consiguiente, la composición de la presente invención puede usarse para tratar y/o prevenir la hipocalcemia, en particular en ganado, en particular vacas, cabras y ovejas. La composición puede usarse también para tratar y/o prevenir hipocalcemia en humanos. La hipocalcemia puede tener muchas causas y orígenes, incluyendo, por ejemplo, trastornos alimentarios, enfermedades hereditarias, deficiencia de vitamina D, exposición al sol disminuida, solo por mencionar unas pocas causas seleccionadas arbitrariamente.

40 En el ganado, la hipocalcemia puede darse con el parto o puede darse poco antes y/o después del parto, debido al comienzo de la producción de leche mamaria. En vacas, la fiebre de la leche puede darse, la cual en casos graves, puede llevar a la muerte de la vaca. La fiebre de la leche provoca importantes daños.

Por consiguiente, la composición y formulaciones descritas en esta memoria pueden usarse para tratar y/o prevenir la fiebre de la leche, en particular en vacas productoras de leche y/o mayores, preferiblemente en el periodo alrededor de y/o después del parto.

45 La presencia de una formulación de liberación retardada y una liberación instantánea en la composición es particularmente ventajosa para la prevención y/o tratamiento de la fiebre de la leche. Gracias a la composición de la invención, la composición puede administrarse solo una vez, en un único tratamiento, preferiblemente poco antes del parto. Como se trata anteriormente, una única administración de calcio o 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ sintética podría ser contraproducente si el momento de administración no es óptimo, por ejemplo un tiempo demasiado largo antes del parto. Gracias a la composición de la invención, la ventana temporal en que la composición puede administrarse se vuelve mayor, haciendo más probable un tratamiento con éxito. Esto se aplica también y en particular si la composición se administra solo una vez. La ventana temporal mayor antes del parto es importante, porque el momento exacto del parto puede, por supuesto, no siempre predecirse con exactitud. La longitud exacta del periodo de gestación está, por supuesto, sometido a una cierta variación.

Se ha observado que la composición de la invención puede ser efectiva si se administra durante hasta 3 días antes del parto, preferiblemente hasta 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 días ante partum (antes del parto) o a los primeros signos de parto inminente. Si se administra en cantidades adecuadas, una única administración de la composición de la invención puede aumentar los niveles de calcio en sangre durante hasta 3-10 días.

- 5 Según una realización del método y/o de la composición de la invención, la composición se administra como una única dosis de administración a un mamífero gestante antes del parto, preferiblemente en el periodo de hasta 9 días antes del parto, 8 días a 0,5 horas, 7 días a 1 hora antes del parto, preferiblemente 96 a 12 horas antes del parto, lo más preferiblemente 72 a 24 horas del parto o en las primeras señales de parto inminente. “Antes del nacimiento” o “antes del parto” para el propósito de la presente memoria, se refiere al periodo que termina con el comienzo del proceso de parto, preferiblemente al periodo que dura hasta la primera contracción/dolores del parto.

En una vaca gestante, la composición se administra preferiblemente como una única dosis 2 a 4 días antes del parto. Los intervalos de tiempo indicados se determinan preferiblemente en la base de una estimación del periodo de gestación promedio. Si, después de la administración de la composición tiene lugar un lapso de 5 o más días sin parto, se administra preferiblemente una dosis de aplicación adicional (típicamente un bolo).

- 15 El momento de administración de la dosis de administración única antes del nacimiento/parto puede determinarse por cálculo si se conoce el día de inseminación. El periodo de gestación de vacas es generalmente 279-292 días y puede saberse de forma más precisa para una raza de vaca específica. Por consiguiente, la composición de la invención puede administrarse como una dosis de administración única 277 a 290 días después de la inseminación, por ejemplo, 280 días después de la inseminación.

- 20 En los métodos profilácticos y los métodos de tratamiento de la invención, la composición de la invención se administra preferiblemente a un sujeto que lo necesite. El sujeto puede ser un humano o uno de los animales especificados anteriormente. Si el método afecta en particular a la prevención y/o tratamiento de la fiebre de la leche, el sujeto se selecciona a partir del ganado, en particular de una vaca, oveja o cabra, preferiblemente a partir de un animal gestante.

- 25 La cantidad de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ a administrar puede determinarse por el experto en dependencia de las circunstancias y/o el sujeto en cuestión. Como una guía, 50 ng a 1,5 µg, preferiblemente 100 ng a 1,3 µg, 200 ng a 1,0 µg, más preferiblemente 300 a 800 ng, lo más preferiblemente 400 a 700 ng, por ejemplo, 350 a 600 ng, 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ glicósidos pueden administrarse por kg de peso corporal del sujeto. Estas cantidades pueden aplicarse para vacas, por ejemplo.

- 30 La presente invención se ilustrará ahora por medio de ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de esta invención, que se define por las reivindicaciones anexas.

Ejemplos

Ejemplos 1 y 2: Preparación de extractos de *Solanum glaucophyllum*

Ejemplo 1: Extracto obtenido por maceración

- 35 300 kg de hojas secas de *S. glaucophyllum* se molieron a tamaños de partícula de 10-15 mm. El polvo se añadió a una mezcla disolvente de agua y etanol en una relación de 7:3 (agua:alcohol, v:v) y a una relación en peso de 1:10 (hojas secas en polvo:disolvente) y se agitó durante 10 horas a 40°C durante la extracción.

La fase líquida se separa por filtración y el proceso se repite hasta dos veces usando las mismas hojas.

- 40 Al final, 0,5% en peso de ácido ascórbico se añade como un antioxidante y el pH se ajusta a 6 usando ácido acético. La fase líquida total se evapora en un evaporador de capa fina a un contenido de materia seca de aproximadamente 35% en peso.

El extracto concentrado se analiza y se determina la concentración de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos. El eluido se trata por calor (UHT) para eliminar gérmenes. Se añade maltodextrina (calidad Ph. Eur.) para ajustar el contenido del principio activo (1,25-(OH)₂ vitamina D₃ total) a un contenido de 50 µg/g (materia seca). La disolución se seca por pulverización hasta sequedad.

- 45 Ejemplo 2: Extracto obtenido por percolación

La misma mezcla de hojas secas y mezcla disolvente como se usa en el Ejemplo 1 se percola en un percolador disponible comercialmente durante 8 horas a 35-45°C.

La fase líquida (extracto en bruto) se trata adicionalmente como se describe en el Ejemplo 1 para dar el mismo producto final como en el Ejemplo 1.

- 50 Ejemplo 3 y 4: Formulaciones de liberación instantánea y retardada que contiene el extracto

Ejemplo 3: Comprimido de liberación instantánea que contiene extracto de *S. glaucophyllum*

Los ingredientes enumerados en la Tabla 4 posterior se mezclaron y prensaron a un comprimido de liberación instantánea.

Tabla 4: Composición del comprimido de liberación instantánea

Ingredientes	(mg/comprimido)
Extracto seco del Ejemplo 1	270
Avicel 102 (celulosa microcristalina)	50
Kollidon CL	100
Estearato de Mg veg.	4
Aerosil 200	7
Peso total	431

5 Ejemplo 4: Comprimido de liberación retardada que contiene extracto de *S. glaucophyllum*

Los ingredientes enumerados en la Tabla 5 posterior se mezclaron y prensaron a un comprimido de liberación retardada. Las características del comprimido se enumeran más abajo en la Tabla 5.

Tabla 5: Composición del comprimido de liberación retardada

Ingredientes	(mg/comprimido)
Extracto seco del Ejemplo 1	270
HPMC (100 M)	400
Eudragit RS	130
Estearato de Mg veg.	8
S02, coloidal	8
Peso total (diana)	830
Peso real promedio (mg)	831,2
dureza/ comprimido (N)	aprox. 170
dimensión (mm)	18 x 8,5 x 6,9
LOD (pérdida de mezcla de comprimido seco) (%)	2,89
Tamaño de carga	435 comprimidos
Rendimiento (comprimidos aceptables)	290 comprimidos
Rendimiento (%)	66,7

- 10 El polímero Eudragit tiene la propiedad de remojarse en contacto con el líquido del rumen y liberar por consiguiente el extracto soluble del Ejemplo 1 lentamente.

Cada comprimido contiene 500 ng de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ determinada de forma analítica por 10 mg de comprimido.

En otras palabras, un comprimido de, por ejemplo, 430 mg contiene 21,5 µg de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃.

- 15 Las características de liberación retardada se evaluaron mediante una prueba de disolución USP estándar (cesta USP, 900 ml de agua, 300 nm) (para más detalles, véanse las indicaciones en esta memoria más arriba). La disolución se midió monitorizando el aumento dependiente del tiempo en la absorción a 300 nm en un espectrofotómetro. El aumento en la absorción se considera como la liberación del extracto en la disolución. Los resultados se muestran en la Figura 1. Puede verse que la formulación de liberación retardada es capaz de liberar 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos contenidos en el extracto de *S. glaucophyllum* de un modo lineal durante un periodo que dura más de 24 horas (1440 minutos), mientras que el mismo principio activo se libera de la forma de liberación rápida en menos de 30 minutos.
- 20

Además, la concentración del principio activo liberado (1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos) se midió en diferentes momentos después de la adición del comprimido al medio de disolución. El resultado se muestra en la Figura 2 y el resultado es análogo a la Figura 1.

Ejemplo 5: Niveles en sangre de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ activa después de la administración única de dos diferentes dosis del extracto vegetal

5 Veinte vacas se distribuyen en dos grupos de 10 animales. Cada vaca recibió una única administración de una cápsula que contiene 10 mg (grupo 1) o 20 mg (grupo 2) de extracto de *S. glaucophyllum* del Ejemplo 1 por kg de peso del animal. Las muestras de sangre se recogieron antes y en diferentes momentos después de la administración y se determinó la concentración de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ usando un kit de prueba ELISA (Immundiagnostik Bensheim, Alemania). Los grupos de 3 y 4 animales de cada tratamiento se acumularon y los resultados se muestran en la Figura 3. Como puede verse, el extracto vegetal aumenta significativamente la concentración de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ en suero de una manera dependiente de la dosis. De nuevo, no se observaron efectos secundarios del tratamiento.

10 Ejemplo 6: Experimento *in vivo* usando la composición de la invención

15 Veinticinco vacas de las razas marrones, Fleckvieh y Holstein de un peso de aproximadamente 500-600 kg de peso y que incluyen sujetos lactantes y no lactantes se distribuyeron en 5 grupos de tratamiento como se detalla en la Tabla 6 posterior. Se proporciona a los animales una única dosis del preparado de prueba oralmente por bolo. Se sacó sangre en el tiempo 0 (antes de la aplicación) y en los días 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9 y 11 después de la aplicación. A partir de la sangre, se preparó suero y se analizó el calcio (total), fosfato y 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ según métodos clínico-químicos establecidos.

20 Tratamiento: todos los preparados de prueba se aplicaron al animal como un único bolo en una cápsula de gelatina (longitud 7 cm, diámetro 2,2 cm y volumen 24 mL, Capsula GmbH, Ratingen, Alemania) con la ayuda de un aplicador de bolo normal. El volumen que no se llenó con comprimidos se llenó con pectina como excipiente inerte. El grupo de control solo recibió pectina.

Los bolos contenidos, de acuerdo con el grupo de tratamiento, los comprimidos de liberación instantánea como se describen en el Ejemplo 3 (grupos 2 y 4) y los comprimidos de liberación retardada como se preparan en el Ejemplo 4 (grupos 1 y 4).

Tabla 6: Grupos de tratamiento

Grupo	Preparado	Dosis
1	Forma de liberación retardada del extracto de <i>Solanum glaucophyllum</i>	10 mg/kg de peso corporal (corresponde a 500 ng de 1,25-(OH) ₂ vitamina D ₃)
2	Forma de liberación instantánea del extracto de <i>Solanum glaucophyllum</i> .	10 mg/kg de peso corporal (corresponde a 500 ng de 1,25-(OH) ₂ vitamina D ₃)
3	1,25-(OH) ₂ vitamina D ₃ sintética (Cerbios Pharma SA Barbengo, Suiza)	500 ng de 1,25-(OH) ₂ vitamina D ₃
4	Combinación de formas de liberación retardada e instantánea	5 + 5 mg/kg de peso corporal (corresponde a 500 ng de 1,25-(OH) ₂ vitamina D ₃)
5	Control	Pectina como excipiente inerte

25 Los resultados de estos experimentos se presentan en las Tablas 7-9 posteriores que muestran las concentraciones de calcio, fosfato y 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ en suero determinadas en cada grupo y el rendimiento de la comparación estadística de los tratamientos.

ES 2 778 901 T3

Tabla 7: Calcio en suero en mmoles/L (media \pm desviación estándar) en los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 en los grupos de tratamiento (n = 5).

Calcio en suero (mmoles/l)					
días	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
0	2,47 \pm 0,06	2,50 \pm 0,06	2,40 \pm 0,02	2,46 \pm 0,11	2,40 \pm 0,06
1	2,75 \pm 0,06 cE	2,67 \pm 0,03 E	2,64 \pm 0,05 E	2,68 \pm 0,12 e	2,44 \pm 0,09
2	2,89 \pm 0,07 bCE	2,74 \pm 0,07 E	2,67 \pm 0,09 Ed	2,81 \pm 0,12 E	2,39 \pm 0,02
3	2,82 \pm 0,06 cE	2,75 \pm 0,11 E	2,72 \pm 0,09 E	2,81 \pm 0,08 E	2,42 \pm 0,03
4	2,86 \pm 0,03 BCE	2,72 \pm 0,06 E	2,72 \pm 0,06 E	2,78 \pm 0,10 E	2,45 \pm 0,05
5	2,81 \pm 0,06 CE	2,64 \pm 0,16 e	2,61 \pm 0,02 E	2,76 \pm 0,11 E	2,46 \pm 0,03
7	2,77 \pm 0,09 bCE	2,60 \pm 0,11	2,57 \pm 0,06 e	2,71 \pm 0,16 e	2,44 \pm 0,06
9	2,64 \pm 0,12 E	2,59 \pm 0,07 E	2,56 \pm 0,09	2,57 \pm 0,11	2,46 \pm 0,02
11	2,48 \pm 0,12	2,44 \pm 0,06	2,45 \pm 0,02	2,45 \pm 0,05	2,40 \pm 0,05
^a (p < 0,05) ^A (p < 0,01) frente a G1 (forma SR solo) ^b (p < 0,05) ^B (p < 0,01) frente a G2 (forma IR solo) ^c (p < 0,05) ^C (p < 0,01) frente a G3 (1,25(OH) ₂ D ₃) ^d (p < 0,05) ^D (p < 0,01) frente a G4 (combinación) ^e (p < 0,05) ^E (p < 0,01) frente a G5 (control)					

Tabla 8: Fosfato en suero en mmoles/L (media \pm desviación estándar) en los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 en grupos de tratamiento (n = 5).

Fósforo en suero (mmoles/l)					
Día	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
0	2,33 \pm 0,11	2,44 \pm 0,06 ce	2,30 \pm 0,07	2,35 \pm 0,38	2,24 \pm 0,17
1	2,98 \pm 0,18 CE	2,84 \pm 0,18 CE	2,50 \pm 0,12 ed	2,85 \pm 0,24 E	2,07 \pm 0,30
2	3,30 \pm 0,10 CE	3,25 \pm 0,21 E	2,81 \pm 0,25 ED	3,41 \pm 0,15 E	2,12 \pm 0,21
3	3,51 \pm 0,17 cE	3,41 \pm 0,23 cE	3,05 \pm 0,19 Ed	3,38 \pm 0,21 E	2,22 \pm 0,18
4	3,47 \pm 0,29 E	3,45 \pm 0,53 E	3,24 \pm 0,34 E	3,43 \pm 0,12 E	2,38 \pm 0,22
5	2,94 \pm 0,10 Ed	2,71 \pm 0,41 ed	2,60 \pm 0,32 E	3,17 \pm 0,12 E	2,05 \pm 0,15
7	2,98 \pm 0,17 CE	2,66 \pm 0,35 E	2,43 \pm 0,23 e	2,89 \pm 0,19 E	2,06 \pm 0,10
9	2,63 \pm 0,25 bcE	2,10 \pm 0,16 d	2,05 \pm 0,44	2,43 \pm 0,24 e	1,97 \pm 0,08
11	2,47 \pm 0,23 E	2,26 \pm 0,34	2,10 \pm 0,16	2,43 \pm 0,27	2,10 \pm 0,06
^a (p < 0,05) ^A (p < 0,01) frente a G1 (forma SR solo) ^b (p < 0,05) ^B (p < 0,01) frente a G2 (IR solo) ^c (p < 0,05) ^C (p < 0,01) frente a G3 (1,25(OH) ₂ D ₃) ^d (p < 0,05) ^D (p < 0,01) frente a G4 (combinación) ^e (p < 0,05) ^E (p < 0,01) frente a G5 (control)					

Tabla 9: 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ en suero en pg/mL (media de muestras en suero acumuladas) en los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 en grupos de tratamiento (n = 5).

1,25-dihidroxitamina D ₃ en suero (pg/ml)					
Día	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
0	58	30	20	47	30
1	364	291	243	243	10
2	216	156	150	148	30
3	96	58	56	110	36
4	67	28	40	37	8
5	35	53	46	16	28
7	36	34	30	20	19
9	41	22	23	4	20
11	40	16	25	1	21

5 Todos los tratamientos mostraron un aumento en suero de calcio y fosfato en 24 horas y duraron hasta 9 días. Todos los grupos que recibieron los extractos de *S. glaucophyllum* mostraron unas concentraciones mayores de 1,25-(OH)₂ vitamina D₃, calcio y fósforo en suero que el grupo con 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ sintética. Además, el efecto de la forma de liberación retardada y la combinación fue más fuerte que el efecto de la forma de liberación instantánea del extracto. El resultado se presenta también en la Figura 4 (calcio en suero), Figura 5 (fosfato en suero) como el efecto del tratamiento y en la Figura 6 (1,25-(OH)₂ vitamina D₃ en suero) como la causa del efecto.

10 Ejemplo 7: Experimento *in vivo* en vacas gestantes, aplicación antes del parto

En este experimento, una dosis única de la composición inventiva (Slbv) se comparó con el tratamiento del estado de la técnica para la prevención de la fiebre de la leche (Bc). Todos los animales en este experimento se seleccionaron de forma aleatoria de 5 granjas diferentes. Todos los animales eran Fleckvieh alemanas, de entre 2 y 8 años de edad y tenían entre 1 y 7 partos y se atribuyeron de forma aleatoria al tratamiento A (Bc) y al tratamiento B (Slbv). Una parte de la reducción normal del contenido de calcio en la dieta antes del parto, no se hizo profilaxis para la fiebre de la leche.

Los animales eran todos vacas gestantes y los tratamientos se administraron cuando se esperaba que el parto ocurriese en 72 horas (muestreo 1). Los días hasta el parto efectivo se determinaron y finalmente variaron de 1 a 12 días entre las vacas.

20 Tratamiento: Grupo A (Bc)

Aplicación de 4 bolos de una sal de calcio representada como Bovicalc® (Boehringer Ingelheim, Alemania, 43 g de calcio por bolo). Según las recomendaciones de los productores: un primer bolo 24 horas a.p., un segundo bolo alrededor del parto, un tercer bolo 12 a 15 horas después del parto y un cuarto bolo 24 a 30 horas después del parto.

Tratamiento: Grupo B (Slbv)

25 Aplicación de una única dosis de un preparado que contenía:

7 g de extracto de *S. glaucophyllum* a partir de comprimidos de liberación instantánea (Ejemplo 3; Tabla 4);

comprimidos de liberación retardada de 14 g de extracto de *S. glaucophyllum* (Ejemplo 4; Tabla 5);

16 g de dolomita activa;

30 envasados juntos en 2 cápsulas de gelatina (cf fig. 10). La aplicación se dio en 72 a 24 horas antes del parto (a.p.). Los animales en que el parto se dio con más de 96 horas después de la aplicación se excluyeron de la evaluación en este experimento.

En todos los animales, el calcio, fosfato y 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ en suero se determinó a partir de muestras tomadas antes del parto y a intervalos de 2 días después del parto durante 7 días (muestréos 2-5). El análisis se hizo usando métodos clínico-químicos típicos.

35

Resultados: Grupo A

Los 25 animales en este tratamiento cumplieron los criterios de correcta dosificación (el tiempo de administración ante partum). Un animal mostró señales de fiebre de la leche.

Resultados: Grupo B

- 5 De los 31 animales en este tratamiento, 26 animales cumplieron los criterios de recibir el tratamiento en las 72 a 24 horas a.p. Ninguno de estos animales mostró señales de fiebre de la leche. Un animal mostró señales de fiebre de la leche y un animal murió por otras razones no relacionadas con el presente estudio.

Los resultados del calcio, fosfato y $1,25\text{-(OH)}_2$ vitamina D_3 en suero se ve en las Figuras 7-9, respectivamente.

- 10 En conclusión, una única administración de la composición de la invención proporcionó resultados tan buenos o mejores que la administración de cuatro dosis de un preparado de calcio disponible comercialmente previsto para la prevención de fiebre de la leche en vacas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica o veterinaria para usar para prevenir la fiebre de la leche en ganado productor de leche, en forma de una única dosis unitaria que comprende una primera formulación y una segunda formulación comprendiendo ambas un extracto de hojas de *Solanum glaucophyllum*, en donde dicha primera formulación es una formulación de liberación retardada que libera completamente 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos contenidos en dicho extracto en un periodo de tiempo que dura al menos 4 horas o más, en donde dicha segunda formulación es una formulación de liberación instantánea que libera 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos contenidos en dicho extracto completamente antes de 4 horas, en donde el periodo de liberación se determina usando la prueba de disolución descrita en la Farmacopea de EE.UU., capítulo <711> en donde el periodo de liberación se determina *in vitro* mediante inmersión de la formulación en agua a 37°C y determinando el tiempo hasta que todos los 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos se disuelven en agua, en donde dicha composición comprende además dolomita como una fuente de calcio y en donde dicha composición tiene una densidad de al menos 1,2 kg/l (g/ml).
2. La composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la dolomita es dolomita activa por calor.
3. La composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho extracto de hojas de *S. glaucophyllum* se caracteriza por que 1,25-(OH)₂ vitamina D₃-glicósidos son la única forma activa de la vitamina D₃ presente en dicho extracto y/o en que los alcaloides típicos para especies *Solanum* están ausentes, siendo dichos alcaloides ausentes preferiblemente uno, dos o los tres seleccionados de solanina, chaconina y solasodina.
4. La composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha segunda formulación comprende dicho extracto de hojas de *S. glaucophyllum* y uno o más excipientes, que libera rápidamente dicha forma activa de vitamina D₃ después del contacto con agua y/o líquidos digestivos, por ejemplo en el primer estómago o rumen de los rumiantes.
5. La composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichas características de liberación retardada se obtienen incluyendo dicho extracto de hojas de *Solanum glaucophyllum* en una matriz o por recubrimiento de dicha matriz que contiene dicho extracto con un excipiente que libera dicha forma activa de vitamina D₃ de una manera retardada.
6. La composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha matriz comprende componentes que no son o son apenas solubles en agua de manera que dicha matriz se erosiona completamente durante un marco temporal de 4, preferiblemente 12 horas o más y/o en donde dicho excipiente o dicho recubrimiento libera dicha forma activa de vitamina D₃ por difusión a través de dicho recubrimiento y/o por medio de descomposición enzimática en compartimientos específicos del tracto digestivo.
7. La composición para usar según la reivindicación 5 o reivindicación 6, en donde dicho recubrimiento comprende un excipiente, que es resistente al líquido digestivo del estómago, pero que se descompone cuando se pone en contacto con bilis y/o con jugo pancreático.
8. La composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se proporciona en la forma de una o más seleccionadas de un bolo, una cápsula, una composición granular, un granulado, un comprimido, un gel, un polvo y un polvo compactado.
9. La composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se administra al ganado productor de leche gestante 96 a 12 horas antes del parto.

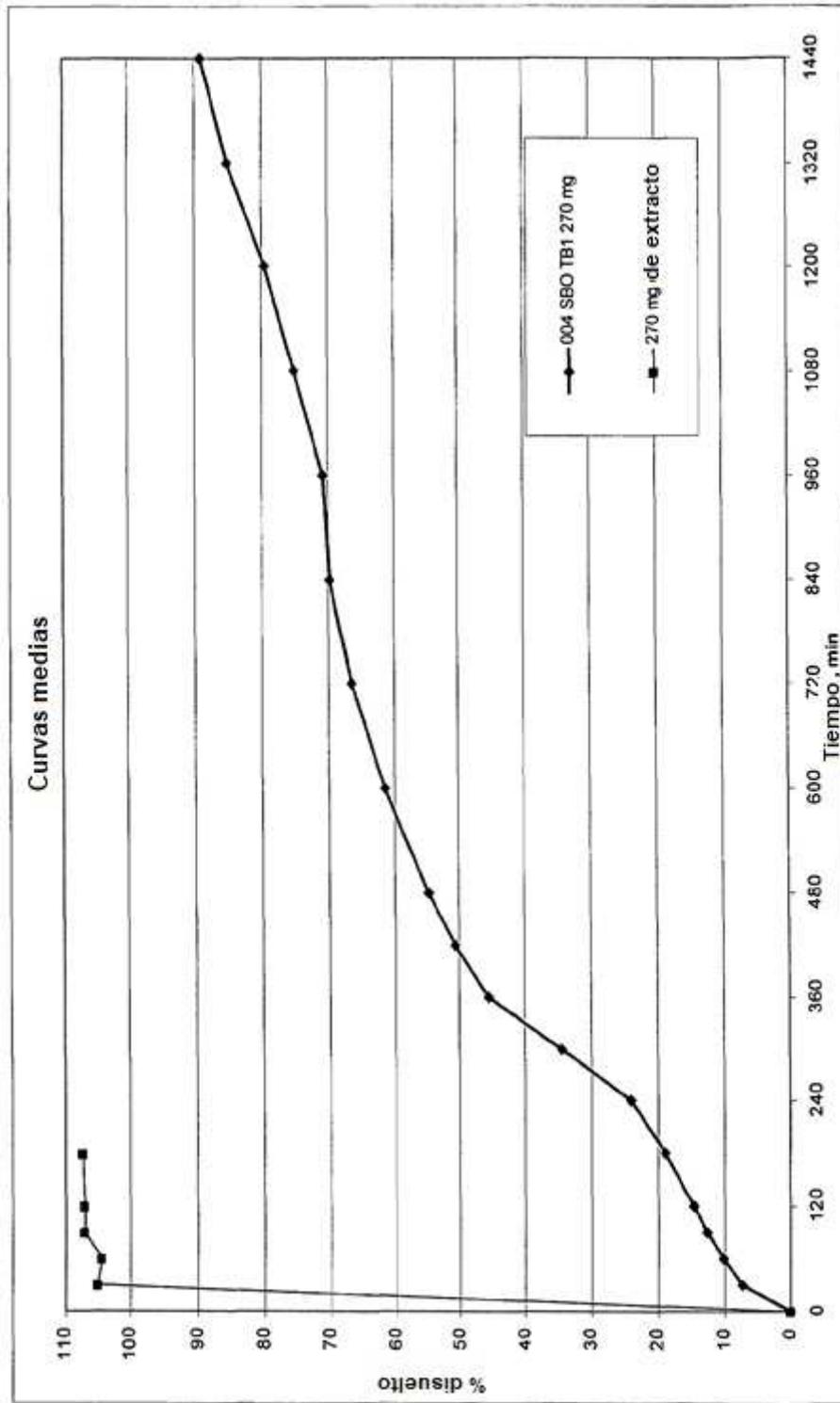


Figura 1

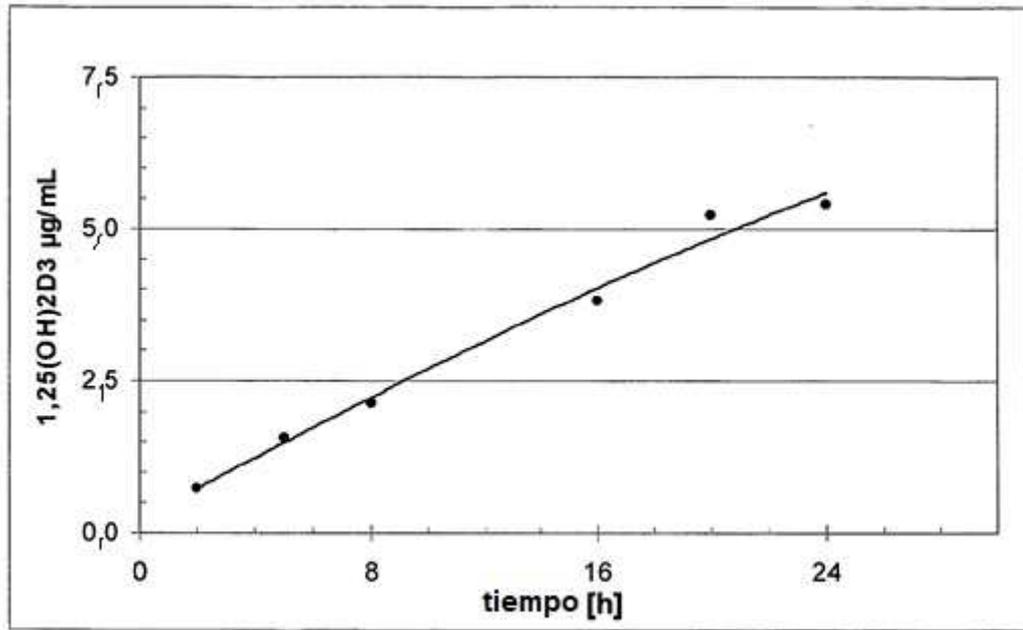


Figura 2

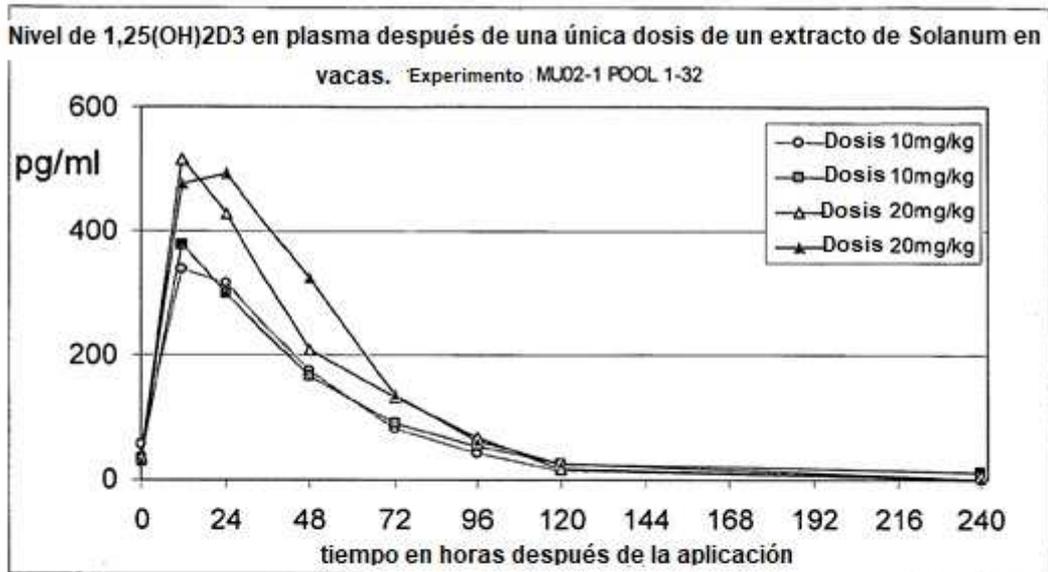


Figura 3

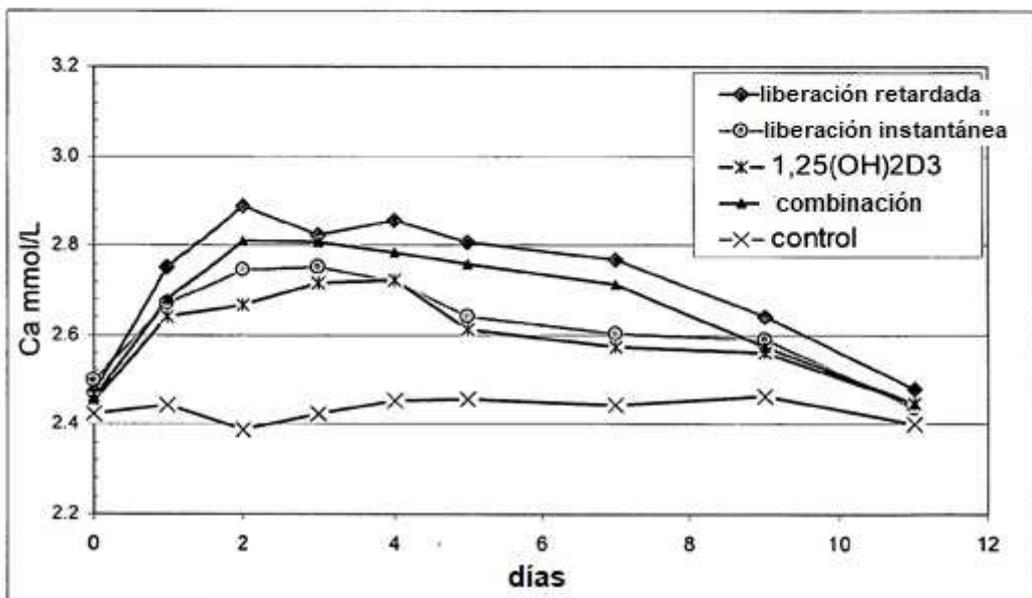


Figura 4

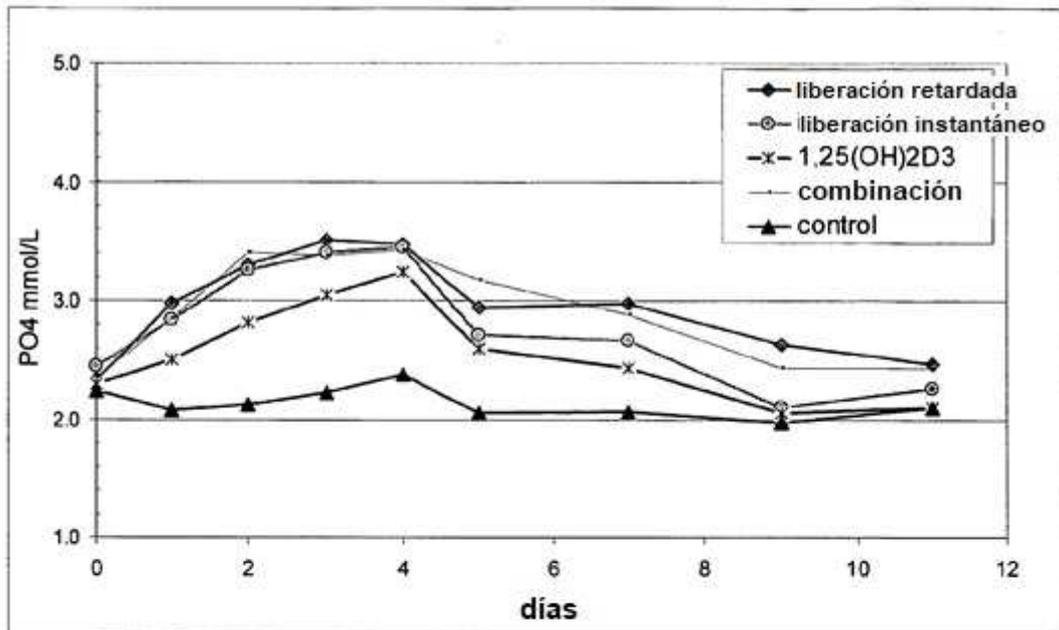


Figura 5

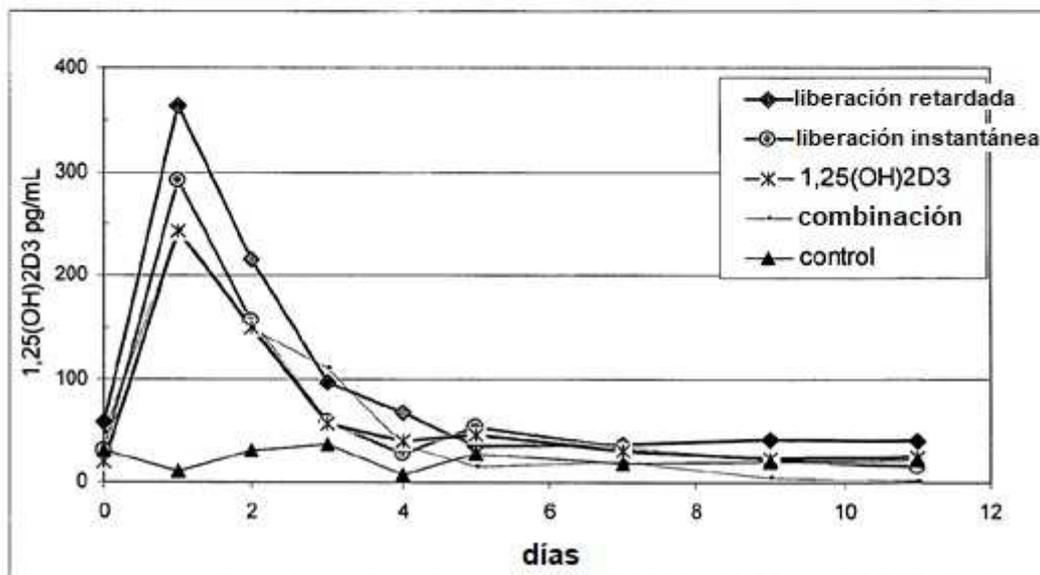


Figura 6

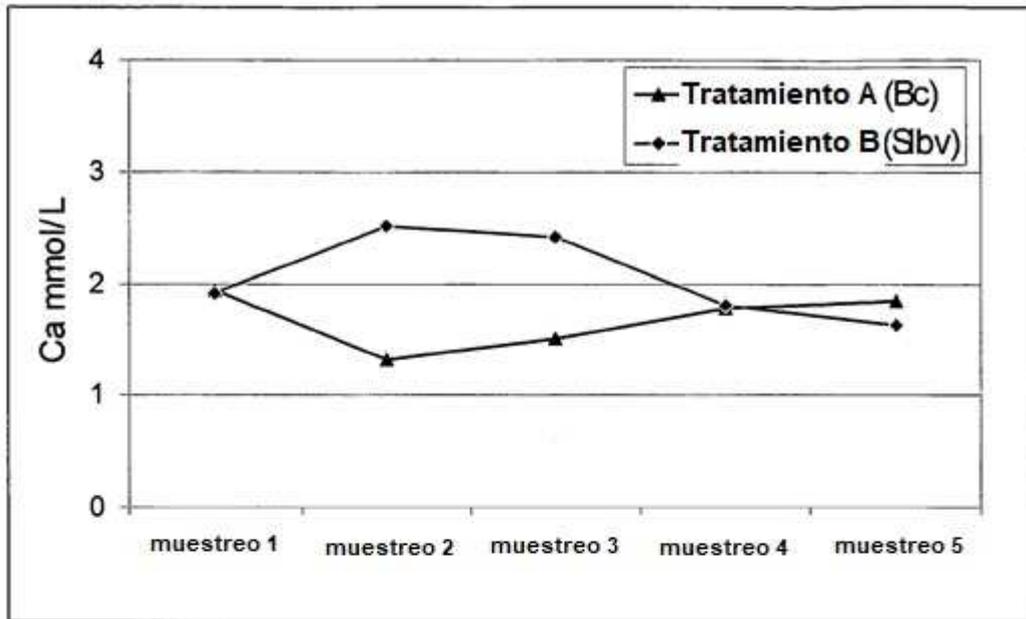


Figura 7

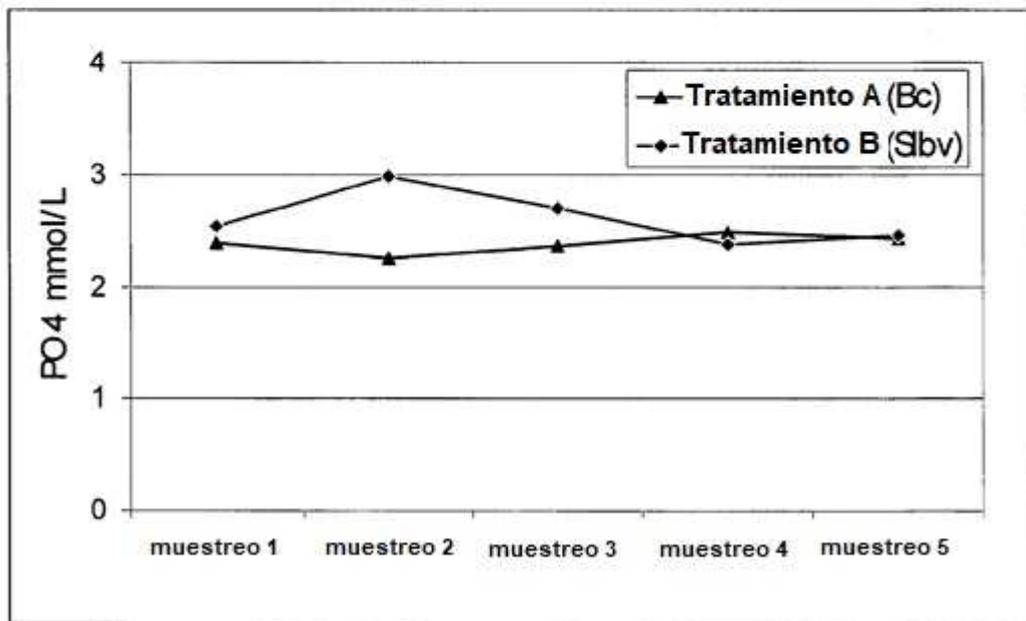


Figura 8

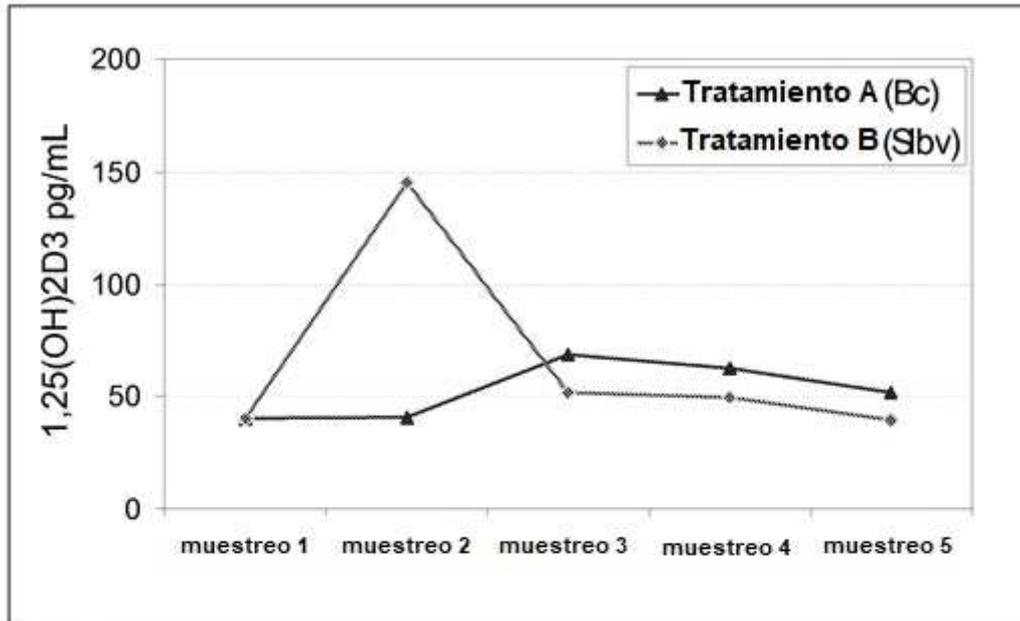


Figura 9



Figura 10