

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 224**

51 Int. Cl.:

A61K 31/57 (2006.01)
A61K 36/42 (2006.01)
A61K 9/02 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2007 PCT/CN2007/002108**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2008 WO08009212**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2007 E 07764016 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2020 EP 2083828**

54 Título: **Un extracto estandarizado y su uso en la fabricación de un medicamento**

30 Prioridad:

10.07.2006 CN 200610098564

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

15.10.2020

73 Titular/es:

**BOTANIC CENTURY (BEIJING) CO., LTD.
(100.0%)**

**310, Tower B, No. 29 Life Science Park Road,
Changping District
Beijing 102206, CN**

72 Inventor/es:

**XIE, CHEN;
LUO, XIUZHEN y
QI, YUN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 787 224 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

Un extracto estandarizado y su uso en la fabricación de un medicamento

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a un extracto estandarizado, una formulación farmacéutica y el uso de extractos en la fabricación de un medicamento para tratar una serie de afecciones diferentes.

Antecedentes de la invención

10 Después de la cirugía abdominal, la función del movimiento intestinal normal puede no recuperarse rutinariamente en 24 horas debido a un traumatismo y anestesia (que causa enteropatía o íleo postoperatorio en etapa temprana). La función intestinal se verá afectada por uno o más de: irritación, derrame de la cavidad abdominal, inflamación y efecto de anestesia, que causan distensión intestinal y sinequias. La última es la principal causa de íleo.

15 Se ha informado que la tasa de incidencia de sinequia intestinal es tan alta como 60-70% en todas las cirugías abdominales, 5% de las cuales desarrollan íleo intestinal. La tasa de recurrencia del íleo es alta (más del 15%) después de la lisis de sinequias. De hecho, cuantas más operaciones, mayor es la tasa de recurrencia. [Editor: Chen Qi, Thoughts and Methods in Study on Medicinal Effectiveness of Chinese Medicine, People's Medical Publishing House p.491-492, 2005].

Los tratamientos actuales para la distensión intestinal y la sinequia en la clínica son la inyección de neostigmina o la administración oral de diferentes fórmulas TCM "purgantes".

20 Aunque la inyección de neostigmina tiene un buen efecto, y no son restricciones para su uso, se ha informado que podría causar efectos secundarios significativos, por ejemplo, cólico intestinal, aumento de la secreción de la glándula y vibración muscular. [Jiang MX and Yang ZC: Medical Pharmacology, People's Medical Publishing House, 3rd ed. Beijing, 1997, p116].

25 La alternativa, administración oral de fórmulas TCM, también tiene algunas desventajas, por ejemplo, los volúmenes grandes son difíciles de tomar, y no se recomiendan tradicionalmente inmediatamente después de la operación (los pacientes postoperatorios deben estar en ayunas hasta que se produzca flato y éste sea un signo de recuperación de la función gastrointestinal). Sin embargo, se ha informado que cuanto antes se use la fórmula TCM después de la cirugía, mejores serán los resultados terapéuticos [Ma GX and Hou BZ: Clinical analysis on 405 cases of postoperative intestinal distension with Pai Qi Decoction, Chinese Medicine of Factory and Mine, 2002, 15(1): p72-73]

30 Kudingxiang (Base de melón) es el tallo del fruto seco de *Cucumis melo L.* (familia Cucurbitaceae). Las funciones e indicaciones de la base de melón (Kudingxiang) descritas en the Chinese Materia Medica (Vol V. p4580) e Inner Mongolia Standard for Materia Medica (1988, p64) son:

- Inducir el vómito y la diuresis.
- Expulsar la humedad y reducir la ictericia.

Se usa para tratar:

- 35 • Accidente cerebrovascular,
- Epilepsia,
- Dolor de garganta,
- Asfixia por higos flemática,
- Falta de aliento,
- Dispepsia,
- 40 • Distensión abdominal, y
- Tipo de ictericia por calor húmedo en términos de TCM.

Se considera como una hierba emética en el sistema TCM debido a su acción estimulante sobre la mucosa gástrica y su activación refleja del nervio central del vómito.

45 Las cucurbitacinas son las principales sustancias químicas en base de melón. Se ha informado en la revista Chinese Traditional and Herbal Drugs (Vol. 23, No.11, 1992) que las cucurbitacinas tienen citotoxicidad y actividad antitumoral, ofrecen protección hepática, antihepatitis, mejora de la función inmune, antiqumiocarcinogénesis, un aumento de la permeabilidad capilar y vómitos inducidos.

Un producto hecho de base de melón, y actualmente vendido en los mercados chinos, es el comprimido "Hu Lu Su" (que significa comprimido de cucurbitacinas). La especificación del producto se registró en the 'Standard Specification of Traditional Chinese Medicines (Vol. 19)' emitida por el ministerio de salud de China.

5 Los comprimidos comprenden un extracto de etanol purificado de la materia prima de base de melón y el producto químico principal en el comprimido es cucurbitacina B, cuyo contenido es no menos del 60% como se indica en la especificación estándar anterior. Las funciones e indicaciones para el comprimido incluyen:

- Eliminar toxinas y eliminar el calor, y
- Inducir la diuresis y expulsar la ictericia.

10 y se usa como tratamiento complementario para la hepatitis persistente debido al calor tóxico severo, la hepatitis crónica y el carcinoma hepático primario.

15 La base de melón no tenía la función de "purgante" en TCM, pero Edery et al. informaron que la inyección intravenosa de 0.5 mg/kg o más de cucurbitacina D aislada de *Ecballium elaterium L.* indujo diarrea en gatos, perros o ratas conscientes, y también estimuló la enterocinesia en perros anestesiados. Pero en el ileon de cobaya aislado, una concentración de 54 mg/ml de cucurbitacina D no causó ningún efecto visible [H. Edery, G. Schatzberg Porath, S Gitter. Pharmacodynamic activity of Elatericin (Cucurbitacin D) Arch Int Pharmacodyn.1961, 13(3~4):315~335].

Es un objetivo de la presente invención desarrollar un medicamento que prevenga la distensión intestinal y la sinequia y acelere la restauración de la gastroenterocinesia. Dicho medicamento tendrá un impacto significativo en la recuperación de un paciente después de la cirugía.

20 El solicitante ha desarrollado un extracto estandarizado que comprende cucurbitacina D de *Cucumis melo L.* y lo usó para desarrollar una formulación para administración rectal que ha demostrado ser eficaz en estudios con animales.

El extracto se puede usar solo o en combinación con otros ingredientes botánicos o sustancias químicas para formar la preparación farmacéutica.

25 Además, la formulación evita el efecto de derivación hepática asociado con las formas orales, es de acción rápida y parece no beneficiarse de ningún efecto secundario obvio del espasmo muscular, un problema con la neostigmina como el tratamiento preferido actual.

Campo técnico de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un extracto estandarizado de *Cucumis melo L.*

El extracto está estandarizado por referencia al contenido de uno o más miembros de la familia de compuestos conocidos como cucurbitacinas (incluidas las isocucurbitacinas).

30 Estos incluyen: cucurbitacina D, cucurbitacina A, cucurbitacina B, cucurbitacina E, isocucurbitacina B e isocucurbitacina D.

Preferiblemente, el extracto se estandariza con referencia a cucurbitacina D, que se cree que es un ingrediente activo.

Sin embargo, el extracto se puede estandarizar alternativamente con referencia a cucurbitacina B.

35 De hecho, el extracto se puede estandarizar por referencia a una cantidad/intervalo de tanto la cucurbitacina D como la cucurbitacina B.

Preferiblemente, el extracto es un extracto completo de cucurbitacinas.

Como alternativa, el extracto puede ser una fracción purificada o selectiva.

El extracto o una fracción selectiva comprende preferiblemente al menos cucurbitacina D y más preferiblemente adicionalmente cucurbitacina B.

40 De hecho, podría comprender, sin limitación, cualquier permutación de las dos, tres, cuatro, cinco o seis cucurbitacinas e isocucurbitacinas especificadas.

Más preferiblemente, el extracto comprende las cucurbitacinas B y D más al menos una de los siguientes: cucurbitacina A, cucurbitacina E, isocucurbitacina B e isocucurbitacina D.

Aún más preferiblemente, el extracto comprende las cucurbitacinas B y D junto con cada uno de los siguientes:

45 cucurbitacina A, cucurbitacina E, y opcionalmente también, cada una de isocucurbitacina B y/o isocucurbitacina D.

A partir de lo anterior, será evidente que para llegar a un extracto consistente es importante estandarizar la dosis contra uno o más marcadores/activos percibidos.

En una realización preferida, la proporción de cucurbitacina B/cucurbitacina D en el extracto es de entre 30:1 a 1:10, más preferiblemente todavía entre 10:1 y 1:2 y más preferiblemente todavía entre 3:1 y 1:1.

5 Como el solicitante ha demostrado que los extractos que contienen cucurbitacina D y cucurbitacina B demuestran actividad, se prefiere que uno o más de estos compuestos se usen para estandarizar el extracto para su uso como medicamento. De hecho, puede ser preferible estandarizar el extracto contra el contenido de cucurbitacina D o B o dentro de un intervalo estrechamente definido.

10 Los extractos según la invención se pueden obtener mediante una serie de metodologías de extracción alternativas que pueden incluir adicionalmente "purificación" adicional o etapas de extracción adicionales.

A modo de ejemplo solamente, los métodos de extracción con disolventes apropiados incluyen, pero no se limitan a, el uso de agua, disolventes polares, tales como etanol y metanol, y sus soluciones acuosas.

Los métodos de extracción, usando los disolventes mencionados anteriormente, incluyen extracción por reflujo térmico (incluida la extracción Soxhlet), percolación y maceración a temperatura ambiente.

15 El disolvente preferido es el agua.

El método de extracción preferido es una extracción por reflujo térmico.

En base a la propiedad física de la materia prima y la cantidad de agua usada, el procedimiento de extracción se puede repetir hasta cuatro veces. La duración de extracción habitual es de 0.5- 2 horas y la duración de extracción preferida es de una hora. La cantidad de agua que se va a usar es de 8-10 veces el peso de la materia prima.

20 Preferiblemente, la extracción es seguida por una etapa de purificación. La etapa de purificación preferida es una etapa de precipitación con etanol.

Cuando se agrega el primer concentrado a la solución de etanol, la concentración final de etanol debe estar entre 50% y 80%, preferiblemente 70%. Bajo esta condición, el contenido de los compuestos activos y la composición son los más apropiados para la aplicación farmacéutica.

25 De este modo, un procedimiento combinado de extracción y purificación preferido puede comprender las etapas de:

- Pulverizar la materia prima de la base de melón,
- Extraer con agua y obtener un extracto líquido,
- Concentrar el extracto líquido para obtener un primer concentrado,
- Agregar el primer concentrado al etanol,
- 30 • Agitar muy bien, reservar, filtrar y concentrar la solución para obtener un segundo concentrado,
- Recuperar el etanol y secar el segundo concentrado para obtener un extracto purificado.

Los procedimientos de purificación alternativos o adicionales incluyen purificación líquido-líquido y purificación de resina.

35 De este modo, el primer y el segundo concentrado de, por ejemplo, el procedimiento de purificación de extracción combinado preferido descrito anteriormente se puede purificar adicionalmente por partición líquido-líquido. Los disolventes apropiados incluyen: cloroformo, cloruro de metileno, éter y acetato de etilo.

Una etapa de partición líquido-líquido se debe llevar a cabo generalmente una pluralidad de veces, digamos 2-5 veces, preferiblemente 3 veces.

Después de la partición líquido-líquido, se recuperan los disolventes. Los concentrados de la partición líquido-líquido se secan para obtener extractos que se pueden usar en la fabricación de un medicamento.

40 Un método de purificación alternativo es disolver el primer o segundo concentrado en agua y colocar la solución en una columna llena de una resina macroporosa. El procedimiento puede comprender las etapas de:

- Lavar la columna con agua.
- Permitir que se ejecute a través de la columna,
- Tirar la solución de agua,

ES 2 787 224 T3

- Eluir con uno o varios de los siguientes disolventes: metanol, etanol, etanol acuoso y metanol acuoso,
- Recoger los eluyentes,
- Concentrar el eluyente al vacío y recuperar el disolvente, y
- Secar los concentrados para obtener un extracto purificado.

5 La resina de absorción macroporosa puede ser D 101, AB-8 o cualquier otra resina apropiada.

El D-101 es fabricado por Huishi Resin Factory, Shanghai, China. Es una resina no polar con las siguientes especificaciones:

Tabla 1

% de agua	65-75
Densidad húmeda g/ml	0.65-0.75
Tamaño de partícula (0.25-0.84mm)	> o = a 95
Tasa de área de superficie m ² g	500-550
Diámetro promedio de la cámara	90-100

10 El AB-8 es fabricado por Nankai Chemicals, Tianjin, China. Es una resina no polar con las siguientes especificaciones:

Tabla 2

% de agua	65-75
Densidad húmeda g/ml	1.00-1.10
Tamaño de partícula (0.25-0.84mm)	> o = a 95
Tasa de área de superficie m ² g	480-5250
Diámetro promedio de la cámara	13-14

La elución puede ser una elución isocrática o gradiente.

15 Los métodos de secado usados en la preparación de los extractos pueden incluir, pero no se limitan a, secado al vacío y secado por pulverización.

Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende un extracto estandarizado de *Cucumis melo L.* en forma de dosificación unitaria.

Preferiblemente, la formulación farmacéutica está estandarizada con referencia a una cucurbitacina (incluidas las isocucurbitacinas).

20 Más preferiblemente, la cucurbitacina estandarizada es cucurbitacina D, aunque se puede usar cucurbitacina B.

Preferiblemente, cuando la proporción de cucurbitacina B/Cucurbitacina D está entre 3:1 y 1:1, la formulación está estandarizada para proporcionar una dosis diaria (basada en un paciente de 65 kg) que contiene desde 0.0040 mg a 40 mg de cucurbitacina D, más preferiblemente de 0.04 mg a 4.0 mg de cucurbitacina D y más preferiblemente todavía entre 0.1 mg y 1.6 mg, con la dosis estándar preferida que contiene aproximadamente 0.40 mg.

25 Como alternativa, cuando la proporción de cucurbitacina B/Cucurbitacina D está entre 3:1 y 1:1, la formulación se puede estandarizar para proporcionar una dosis diaria (basada en un paciente de 65 g) que contiene desde 0.0064 a 64 mg de cucurbitacina B, más preferiblemente desde 0.064 a 6.4 mg de cucurbitacina B y más preferiblemente todavía entre 0.16 mg y 2.6 mg, con la dosis estándar preferida que contiene aproximadamente 0.64 mg.

30 Preferiblemente, la formulación farmacéutica es apropiada para la administración rectal. Más preferiblemente toma la forma de un supositorio.

Los portadores para administración rectal incluyen:

- Bases lipofólicas que incluyen: ésteres de ácidos grasos naturales, glicéridos semisintéticos o aceite vegetal hidrogenado;
 - Bases hidrofólicas que incluyen: gelatina, glicerina, polietilenglicol, polioxil [40] estearato, Tween 61, monoestearato de polioxetilén sorbitano o poloxámero (Pluronic);
- 5
- Aditivos que incluyen: surfactantes tales como Tween 80;
 - Quelantes que incluyen: EDTA, citrato trisódico deshidratado o derivados de enamina;
 - Agentes antiinflamatorios no esteroideos que incluyen: salicilato de sodio;
 - Antioxidantes que incluyen: hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) o galato de galocatequina;
- y
- 10
- Conservantes que incluyen: ésteres del ácido para-hidroxibenzoico.

El medicamento administrado por una ruta rectal se absorbe a través de la mucosa rectal y, en consecuencia, aproximadamente del 50% al 70% de la medicación no ingresa al hígado. Como resultado, el metabolismo de la medicación en el hígado y la toxicidad hepática se reducen. La administración rectal también evita la irritación de la mucosa gástrica.

- 15
- Un supositorio rectal es fácil de usar y se puede administrar tanto a pacientes internos como externos. Se absorbe fácilmente, surte efecto rápidamente y tiene una alta biodisponibilidad. El medicamento puede acortar la duración de la recuperación y rehabilitación postoperatoriamente sin limitación en la función gastrointestinal del sujeto.

Sin embargo, se contemplan modos alternativos de suministro y están dentro del alcance de la invención.

- 20
- De este modo, los extractos se pueden preparar en diferentes formas de dosificación mediante preparación farmacéutica convencional. El extracto de la invención se puede combinar con cualquier portador farmacológico fisiológicamente aceptable para formar una preparación farmacéutica con el fin de proporcionar el medicamento a los sujetos a través de diferentes rutas, por ejemplo, oral o mediante inyección. Las formas inyectables incluyen inyección subcutánea, inyección intradérmica, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección intravenosa, inyección intranasal e inyección de punto de acupuntura. Como alternativa, el medicamento se podría introducir directamente en el
- 25
- sitio quirúrgico.

- 30
- El extracto en la presente invención se podría convertir en medicamentos inyectables que incluyen soluciones, emulsiones, suspensiones y polvos inyectables. Como formulaciones de inyección, los portadores fisiológicamente aceptables incluyen un medio farmacéuticamente aceptable y se pueden usar aditivos. Los medios farmacéuticamente aceptables incluyen: agua, disolventes no acuosos o disolventes compuestos. Los disolventes no acuosos incluyen aceites inyectables, etanol, glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, benzoato de bencilo, dimetil acetamida, dimetilsulfóxido y miristato de isopropilo. Los aditivos incluyen solubilizantes, antioxidantes, regulador isotónico, solución reguladora, agentes de suspensión, estabilizantes, agente quelante, agente antibacteriano y relleno, tal como Tween-80, fosfato, metilcelulosa, creatinina, sulfito de sodio, cloruro de sodio, sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético, lactosa y fenol.

- 35
- Con base en estudios farmacológicos significativos, el solicitante ha encontrado que un extracto de base de melón hecho de, por ejemplo, la extracción acuosa y la precipitación de etanol posee efectos beneficiosos significativos que incluyen lo siguiente:

- Activar la gastroenterocinesia;
 - Estimular el movimiento gastrointestinal sin cirugía.
- 40
- Impulso de los intestinos grueso y delgado;
 - Activar el vaciado gástrico; y
 - Reducir los intervalos de excreción y aumentar la cantidad de heces.

- 45
- Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un extracto estandarizado de *Cucumis melo L.* para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o para efectuar una o más de las siguientes condiciones:

- Activar la gastroenterocinesia;
- Restauración postoperatoria de gastroenterocinesia;
- Reducir la duración del flato postoperatorio;

- Tratamientos de estreñimiento;
 - Tratamiento de la adhesión intestinal postoperatoria;
 - Tratamiento de la adhesión intestinal y el íleo;
 - Estimular el movimiento gastrointestinal sin cirugía;
- 5
- Impulso de los intestinos grueso y delgado;
 - Activar el vaciado gástrico;
 - Suavizar el movimiento intestinal; y
 - Reducir los intervalos de excreción y aumentar la cantidad de heces.
- 10
- A partir de lo anterior, será evidente que para llegar a un extracto consistente es importante estandarizar la dosis contra uno o más marcadores/activos percibidos.
- Como el solicitante ha demostrado que los extractos que contienen cucurbitacina D y B demuestran actividad, se prefiere que uno o más de estos compuestos se usen para estandarizar el extracto para su uso como medicamento.
- El marcador preferido es cucurbitacina D, aunque se puede usar cucurbitacina B u otra cucurbitacina o isocucurbitacina.
- 15
- En una realización preferida, la proporción de cucurbitacina B/Cucurbitacina D en el extracto es de entre 30:1 a 1:10, más preferiblemente aún entre 10:1 y 1:2 y aún más preferiblemente entre 3:1 y 1:1.
- Preferiblemente, la cantidad de cucurbitacina D presente en el peso total de las cucurbitacinas, incluidas las isocucurbitacinas, comprende del 5% al 50%, más preferiblemente del 8% al 41%.
- Más particularmente, el solicitante ha demostrado que:
- 20
1. Después de una dosis única de administración rectal del medicamento, la constricción proximal del colon de las ratas anestesiadas mejoró significativamente en 30 minutos, y alcanzó un pico entre 30 min y 60 min.
 2. El medicamento de la presente invención puede activar significativamente el impelente intestinal de los ratones con lesión mecánica intestinal. A una dosis alta, su función era equivalente a la neostigmina, pero sin espasmos musculares, un efecto secundario común encontrado con la neostigmina.
 3. El medicamento puede además:
- 25
- Activar el impelente intestinal de los animales con hipofunción gastrointestinal inducida por atropina.
 - Reducir los intervalos de excreción,
 - Aumentar la cantidad de heces, (contar durante 4 horas) y
 - Mejorar la función del vaciado gástrico en los animales con hipofunción gastrointestinal inducida por atropina.
- 30
- Como se indicó anteriormente, el medicamento de la presente invención puede promover la gastroenterocinesia tanto en animales gastrointestinales normales como inhibidos y también promover movimientos en el estómago, intestino delgado y grueso. Comparativamente hablando, la fuerza del efecto está en orden: intestino grueso> intestino delgado> estómago.
- El extracto de base de melón posee las excelentes características de:
- 35
- Una pequeña cantidad de dosificación,
 - Una baja frecuencia de administración (potencialmente dosis única), y
 - Un inicio de acción rápido.
- Prácticamente, el extracto de base de melón puede activar la gastroenterocinesia y, según sus características, se puede usar en el tratamiento o prevención de:
- 40
- Estreñimiento,
 - Adhesión intestinal e íleo, y
 - Promoción de flatos para activar la restauración de gastroenterocinesia después de una cirugía abdominal.

Según un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un método de tratamiento del cuerpo humano o animal que comprende administrar un extracto o formulación farmacéutica de la invención a un paciente.

La presente invención se describirá adicionalmente, solo a modo de ejemplo, con referencia a la siguiente formulación y datos en los que:

- 5 La figura 1a muestra la estructura química de la cucurbitacina D,
La figura 1b muestra la estructura química de la cucurbitacina B,
La figura 1c muestra la estructura química de la cucurbitacina E,
La figura 1d muestra la estructura química de la isocucurbitacina B,
La figura 1e muestra la estructura química de la cucurbitacina A, y
- 10 La figura 1f muestra las estructuras químicas de la isocucurbitacina D;
La figura 2a es una huella digital de HPLC del primer concentrado usado en el ejemplo 1,
La figura 2b es una huella digital de HPLC del extracto de base de melón usado en el ejemplo 2,
La figura 2c es una huella digital de HPLC del segundo concentrado usado en el ejemplo 1,
La figura 2d es una huella digital de HPLC del extracto acuoso purificado con cloroformo usado en el ejemplo 8, y
- 15 La figura 2e es una huella digital de HPLC del extracto tratado con resina macroporosa como se usa en el ejemplo 11;
La figura 3 es un gráfico que muestra el porcentaje de impulso del intestino delgado en ratones normales;
La figura 4 es un gráfico que muestra el porcentaje de impulso del intestino grueso en ratas normales;
La figura 5 es un gráfico que muestra el porcentaje de vaciado gástrico en ratones normales;
La figura 6 es un gráfico que muestra el porcentaje de impulso intestinal en ratones con lesión mecánica;
- 20 La figura 7 es un gráfico que muestra el porcentaje de impulso intestinal en ratones con hipodinámica gastrointestinal causada por atropina;
La figura 8 es un gráfico que muestra el número de contracciones: efecto sobre la contracción proximal del colon en ratas anestesiadas;
La figura 9 es un gráfico que muestra la tasa de contracciones: efecto sobre la contracción proximal del colon en ratas anestesiadas;
- 25 La figura 10 es un gráfico que muestra los índices de amplitud: efecto sobre la contracción proximal del colon en ratas anestesiadas;
La figura 11 es un gráfico que muestra la tasa de amplitud: efecto sobre la contracción proximal del colon en ratas anestesiadas;
- 30 La figura 12 es un gráfico que muestra la prueba de vaciado gastro - hipodinámica gastrointestinal en un modelo de ratón causado por atropina; y
La figura 13 es un gráfico que muestra el resultado del estudio ex vivo registrado: efecto de una dosis de 60 mg/20 ml en íleon de cobaya aislado (de arriba a abajo, las ondas registradas son: antes de la administración, 0, 2, 5 y 10 minutos después de la administración).
- 35 En cada una de las huellas digitales de HPLC (Figuras 2a - 2e):
El pico 1 es cucurbitacina A;
El pico 2 es cucurbitacina D;
El pico 3 es isocucurbitacina D;
El pico 4 es cucurbitacina B;
- 40 El pico 5 es cucurbitacina E; y
El pico 6 es isocucurbitacina B

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

Columna: DIKMA Diamonsil HPLC Columna C18 250 mm X 4.6 mm, 5 µm

Temperatura de columna: 30 °C

Longitud de onda: 232nm

5 Velocidad de flujo: 1.0 min/ml

Fase móvil: A: acetonitrilo: tetrahidrofurano (1:1);

B: elución en gradiente con dos fases de ácido fosfórico al 0.1% - agua (0 min: 30% A; 40min: 70% A)

Descripción detallada

10 La descripción detallada que se proporciona a continuación se expone en tres partes.

- Los ejemplos 1 a 13 describen diferentes métodos de preparación de extractos (extracción y purificación) que contienen cucurbitacinas y los extractos resultantes;
- Los ejemplos 14 a 18 describen formulaciones hechas de una serie de estos extractos; y
- Los experimentos 1 a 12 proporcionan detalles de los estudios realizados que brindan un respaldo creíble para las indicaciones médicas reclamadas.

15

Parte 1. Extractos y metodología de extracción/purificación.

Los siguientes ejemplos ilustran una variedad de metodologías que se pueden usar para obtener extractos que contienen cucurbitacina para uso en medicina.

Ejemplo 1: extracción acuosa y precipitación etanólica

20 La materia prima de base de melón (5 kg) se pulverizó en un polvo grueso y se sometió al siguiente régimen:

1. Agregar 50 kg de agua al polvo grueso y hervir durante aproximadamente 2 horas;
2. Decantar la solución;
3. Agregar otros 40 kg de agua al residuo y hervir durante 1 hora más, luego decantar la solución;
4. Agregar otros 40 kg de agua al residuo y hervir durante 1 hora más, luego decantar la solución;
- 25 5. Recoger las tres soluciones y filtrar;
6. Concentrar la solución para obtener un primer concentrado (7.5 kg);
7. Agregar etanol al concentrado para obtener una solución de etanol al 70%. Agitar completamente, reservar, dejar precipitar durante 24 horas y filtrar;
8. Recuperar el etanol para obtener un segundo concentrado;
- 30 9. Secar por pulverización el segundo concentrado para obtener un extracto sólido.

El extracto sólido obtenido tenía una composición como se muestra en la tabla 3 a continuación:

Tabla 3.

Contenido de cucurbitacina	% (por peso de extracto)
Cucurbitacina B	0.99
Cucurbitacina D	0.61
Cucurbitacina E	0.14
Cucurbitacina A	0.12

ES 2 787 224 T3

Isocucurbitacina D	0.09
Isocucurbitacina B	0.06
TOTAL	
Proporción de cucurbitacina B a cucurbitacina D	1.62:1.0
Proporción de cucurbitacina D a cucurbitacinas total (incluyendo isocucurbitacinas)	0.30:1.0

Ejemplo 2 - Extracción de disolvente usando metanol

La materia prima de base de melón (5 kg) se pulverizó en un polvo grueso y se sometió al siguiente régimen:

1. Agregar 25 kg de metanol y extracto de reflujo con un Soxhlet durante 6 horas;
- 5 2. Concentrar el extracto líquido al vacío y secar por pulverización para obtener un extracto sólido.

El extracto sólido obtenido tenía una composición como se muestra en la tabla 4 a continuación:

Tabla 4.

Contenido de cucurbitacina	% (por peso de extracto)
Cucurbitacina B	5.83
Cucurbitacina D	0.63
Cucurbitacina E	0.03
Cucurbitacina A	0.36
Isocucurbitacina D	No detectado (<0.01 %)
Isocucurbitacina B	0.76
TOTAL	
Proporción de cucurbitacina B a cucurbitacina D	9.25:1.0
Proporción de cucurbitacina D a cucurbitacinas total (incluyendo isocucurbitacinas)	0.08:1.0

Ejemplo 3 - Extracción acuosa y precipitación etanólica (2)

- 10 La materia prima de base de melón (5 kg) se pulverizó en un polvo grueso y se sometió al siguiente régimen:

1. Agregar 30 kg de agua y hervir durante 30 minutos,
2. Verter la solución,
3. Repetir la etapa 1 otras tres veces,
4. Agrupar las soluciones y filtrar,

- 15 5. Concentrar la solución para obtener un primer concentrado (2.5 kg),
6. Agregar etanol para formar una solución de etanol al 65%, agitar completamente y reservar para precipitar durante 18 horas,
7. Filtrar y recuperar el etanol al vacío para obtener un segundo concentrado.
8. Secar el concentrado al vacío para obtener un extracto sólido.

ES 2 787 224 T3

El extracto sólido obtenido tenía una composición como se muestra en la tabla 5 a continuación:

Tabla 5.

Contenido de cucurbitacina	% (por peso de extracto)
Cucurbitacina B	0.87
Cucurbitacina D	0.51
Cucurbitacina E	0.11
Cucurbitacina A	0.10
Isocucurbitacina D	0.07
Isocucurbitacina B	0.05.
TOTAL	
Proporción de cucurbitacina B a cucurbitacina D	1.71:1.0
Proporción de cucurbitacina D a cucurbitacinas total (incluyendo isocucurbitacinas)	0.30:1.0

Ejemplo 4 - Extracción etanólica

5 La materia prima de base de melón (4 kg) se pulverizó en un polvo grueso y se sometió al siguiente régimen:

1. Agregar 25 kg de etanol al 75% y someterlo a extracción por reflujo, con calor, durante 4 horas para obtener un extracto líquido;
2. Secar por pulverización el extracto para obtener el extracto sólido.

El extracto sólido obtenido tenía una composición como se muestra en la tabla 6 a continuación:

10

Tabla 6.

Contenido de cucurbitacina	% (por peso de extracto)
Cucurbitacina B	2.91
Cucurbitacina D	0.58
Cucurbitacina E	No detectado (<0.01 %)
Cucurbitacina A	0.18.
Isocucurbitacina D	No detectado (<0.01 %)
Isocucurbitacina B	0.36
TOTAL	
Proporción de cucurbitacina B a cucurbitacina D	5.02:1.0
Proporción de cucurbitacina D a cucurbitacinas total (incluyendo isocucurbitacinas)	0.14:1.0

Ejemplo 5 - Extracción acuosa y precipitación etanólica (3)

La materia prima de base de melón (3 kg) se pulverizó en un polvo grueso y se sometió a la siguiente metodología.

1. Agregar 30 kg de agua y hervir durante una hora,

2. Verter la solución,
3. Repetir las etapas 1 y 2 otras dos veces,
4. Recoger las soluciones, filtrar y concentrar para obtener un primer concentrado (5 kg),
5. Agregar etanol para formar una solución de etanol al 75%, agitar completamente y reservar para precipitación durante 30 horas,
6. Filtrar y recuperar el etanol al vacío para obtener un segundo concentrado,
7. Secar el concentrado al vacío para obtener un extracto sólido.

El extracto sólido obtenido tenía una composición como se muestra en la tabla 7 a continuación:

Tabla 7.

Contenido de cucurbitacina	% (por peso de extracto)
Cucurbitacina B	0.81
Cucurbitacina D	0.48
Cucurbitacina E	0.10
Cucurbitacina A	0.10
Isocucurbitacina D	0.06
Isocucurbitacina B	0.04
TOTAL	
Proporción de cucurbitacina B a cucurbitacina D	1.69:1.0
Proporción de cucurbitacina D a cucurbitacinas total (incluyendo isocucurbitacinas)	0.30:1.0

10

Ejemplo 6 - Extracción acuosa y precipitación de etanol (4)

La materia prima de la base de melón (4.5 kg) se pulverizó en un polvo grueso y se sometió a la siguiente metodología.

1. Agregar 35 kg de agua y hierva por una hora,
2. Verter la solución,
- 15 3. Repetir 3 veces más,
4. Reunir las soluciones, filtrar y concentrar para obtener un primer concentrado (5 kg),
5. Agregar etanol para formar una solución de etanol al 80%, agitar completamente y reservar para precipitación durante 30 horas,
6. Filtrar y recuperar el etanol al vacío para obtener un segundo concentrado,
- 20 7. Secar por pulverización los concentrados para obtener el extracto sólido.

El extracto sólido obtenido tenía una composición como se muestra en la tabla 8 a continuación:

Tabla 8.

Contenido de cucurbitacina	% (por peso de extracto)
Cucurbitacina B	0.62
Cucurbitacina D	0.58

Cucurbitacina E	0.12
Cucurbitacina A	0.10
Isocucurbitacina D	0.05
Isocucurbitacina B	0.06
TOTAL	
Proporción de cucurbitacina B a cucurbitacina D	1.07:1.0
Proporción de cucurbitacina D a cucurbitacinas total (incluyendo isocucurbitacinas)	0.38:1.0

Ejemplo 7 - Extracción etanólica (2)

La materia prima de base de melón (5 kg) se pulverizó en un polvo grueso y se sometió a la siguiente metodología:

- 5 1. Agregar una cantidad apropiada de etanol al 50% para cubrir el polvo y remojar a temperatura ambiente durante la noche,
2. Aplicar un método de filtración usando otros 60 kg de solución de etanol al 50%,
3. Concentrar la solución al vacío,
4. Secar por pulverización para obtener un extracto sólido.

El extracto sólido obtenido tenía una composición como se muestra en la tabla 9 a continuación:

10

Tabla 9.

Contenido de cucurbitacina	% (por peso de extracto)
Cucurbitacina B	2.78
Cucurbitacina D	0.42
Cucurbitacina E	No detectado (<0.01%)
Cucurbitacina A	No detectado (<0.01%)
Isocucurbitacina D	No detectado (<0.01%)
Isocucurbitacina B	0.03
TOTAL	
Proporción de cucurbitacina B a cucurbitacina D	6.62:1.0
Proporción de cucurbitacina D a cucurbitacinas total (incluyendo isocucurbitacinas)	0.13:1.0

Ejemplo 8 - Purificación de cloroformo

El primer concentrado, como se describe en el ejemplo 1, se sometió a purificación con cloroformo de la siguiente manera:

- 15 1. Disolver el primer concentrado en cloroformo (2/3 en volumen),
2. Separar la solución de cloroformo,
3. Repetir las etapas 1 y 2 otras dos veces,

4. Recoger las soluciones combinadas de cloroformo, recuperar el cloroformo y secar el residuo al vacío para obtener un extracto sólido.

El extracto sólido obtenido tenía una composición como se muestra en la tabla 10 a continuación:

Tabla 10.

Contenido de cucurbitacina	% (por peso de extracto)
Cucurbitacina B	30.68
Cucurbitacina D	24.95
Cucurbitacina E	4.24
Cucurbitacina A	3.50
Isocucurbitacina D	4.24
Isocucurbitacina B	3.50
TOTAL	
Proporción de cucurbitacina B a cucurbitacina D	1.23:1.0
Proporción de cucurbitacina D a cucurbitacinas total (incluyendo isocucurbitacinas)	0.35:1.0

5

Ejemplo 9 - Purificación líquido/líquido

El extracto líquido, como se describe en el ejemplo 2, se tomó y el metanol se recuperó al vacío como se describe a continuación.

- 10 1. Se agregó agua al extracto (el mismo peso que las materias primas) para disolver el residuo y luego se añadió éter (el mismo volumen que el agua) para realizar la partición líquido-líquido,
2. La fracción de éter se recuperó y la etapa 1 se repitió una vez más,
3. Las soluciones de éter se combinaron y el éter se recuperó,
4. El residuo se secó al vacío para obtener un extracto sólido.

El extracto sólido obtenido tenía una composición como se muestra en la tabla 11 a continuación:

15

Tabla 11.

Contenido de cucurbitacina	% (por peso de extracto)
Cucurbitacina B	65.79
Cucurbitacina D	8.45
Cucurbitacina E	0.42
Cucurbitacina A	5.04
Isocucurbitacina D	0.35
Isocucurbitacina B	9.4
TOTAL	
Proporción de cucurbitacina B a cucurbitacina D	7.79:1.0
Proporción de cucurbitacina D a cucurbitacinas total (incluyendo isocucurbitacinas)	0.09:1.0

Ejemplo 10 - Purificación líquido/líquido (2)

El segundo concentrado como se describe en el ejemplo 5 se tomó y se purificó adicionalmente de la siguiente manera:

1. El concentrado se disolvió con agua (el mismo peso que la materia prima),
- 5 2. La partición líquido-líquido se realizó con ½ volúmenes de acetato de etilo 5 veces,
3. Se reunieron las soluciones de acetato de etilo y se recuperó el acetato de etilo.
4. El residuo se secó al vacío para obtener un extracto sólido.

El extracto sólido obtenido tenía una composición como se muestra en la tabla 12 a continuación:

Tabla 12.

Contenido de cucurbitacina	% (por peso de extracto)
Cucurbitacina B	18.94
Cucurbitacina D	12.50
Cucurbitacina E	2.53
Cucurbitacina A	1.98
Isocucurbitacina D	1.84
Isocucurbitacina B	2.02
TOTAL	
Proporción de cucurbitacina B a cucurbitacina D	1.52:1.0
Proporción de cucurbitacina D a cucurbitacinas total (incluyendo isocucurbitacinas)	0.31:1.0

10

Ejemplo 11 - Purificación de resina

El primer concentrado como se describe en el ejemplo 1, se diluyó con agua y se colocó en una columna llena con una resina macroporosa preequilibrada D101 y se purificó de la siguiente manera.

1. La columna se eluyó con agua y luego con etanol al 90%;
- 15 2. La solución de etanol se recogió y el etanol se recuperó al vacío;
3. El residuo se secó por pulverización para obtener un polvo sólido.

El extracto sólido obtenido tenía una composición como se muestra en la tabla 13 a continuación:

Tabla 13.

Contenido de cucurbitacina	% (por peso de extracto)
Cucurbitacina B	47.52
Cucurbitacina D	17.60
Cucurbitacina E	1.72
Cucurbitacina A	3.01
Isocucurbitacina D	1.15
Isocucurbitacina B	3.72

TOTAL	
Proporción de cucurbitacina B a cucurbitacina D	2.70:1.0
Proporción de cucurbitacina D a cucurbitacinas total (incluyendo isocucurbitacinas)	0.24:1.0

Ejemplo 12 - Purificación de resina (2)

El segundo concentrado, como se describe en el ejemplo 6, se diluyó con agua y se colocó en una columna llena de agua, resina macroporosa prebalanceada AB-8 y se purificó de la siguiente manera.

- 5 1. La elución en gradiente se realizó con agua, luego con etanol al 10%, 50% y 90%, respectivamente,
2. Se arrojaron el agua y la solución de etanol al 10% y se recogieron las soluciones de etanol al 50% y 90%,
3. El etanol se recuperó al vacío para obtener un extracto sólido.

El extracto sólido obtenido tenía una composición como se muestra en la tabla 13 a continuación:

Tabla 13.

Contenido de cucurbitacina	% (por peso de extracto)
Cucurbitacina B	13.55
Cucurbitacina D	13.42
Cucurbitacina E	1.10
Cucurbitacina A	2.97
Isocucurbitacina D	0.97
Isocucurbitacina B	0.80
TOTAL	
Proporción de cucurbitacina B a cucurbitacina D	1.01:1.0
Proporción de cucurbitacina D a cucurbitacinas total (incluyendo isocucurbitacinas)	0.41:1.0

10

Ejemplo 13 - Purificación de resina (3)

El concentrado como se describe en el ejemplo 7 se diluyó con agua y se colocó en una columna llena de resina macroporosa prebalanceada de agua AB-8 y se purificó de la siguiente manera.

- 15 1. La elución en gradiente se realizó con agua, luego con etanol al 10%, 50% y 90%, respectivamente,
2. Se arrojaron el agua y la solución de etanol al 10% y se recogieron las soluciones de etanol al 50% y 90%,
3. El etanol se recuperó al vacío para obtener el extracto sólido.

El extracto sólido obtenido tenía una composición como se muestra en la tabla 14 a continuación:

Tabla 14.

Contenido de cucurbitacina	% (por peso de extracto)
Cucurbitacina B	36.88
Cucurbitacina D	6.25

Cucurbitacina E	
Cucurbitacina A	0.14
Isocucurbitacina D	
Isocucurbitacina B	1.11
TOTAL	
Proporción de cucurbitacina B a cucurbitacina D	5.90:1.0
Proporción de cucurbitacina D a cucurbitacinas total (incluyendo isocucurbitacinas)	0.14:1.0

Parte 2 - Producción de medicamentos formulados a partir de extractos.

Ejemplo 14 - Formulación para administración rectal

Se realizó una formulación rectal de la siguiente manera:

- 5 1. El extracto sólido como se describe en el ejemplo 5 se molió en un polvo fino,
 2. Se tomó una cantidad de glicéridos semisintéticos apropiados para formar supositorios de dosificación unitaria (1.2 g) que contenían una dosis deseada (90 mg de extracto) y se fundieron en un baño de agua a 40 °C,
 3. La solución y el polvo se mezclaron y se agitaron completamente,
 4. La solución resultante se vertió en un molde y se enfrió.
- 10 El supositorio rectal resultante contenía 90 mg de extracto estandarizado contra ya sea cucurbitacina D 0.43 mg y/o cucurbitacina B 0.73 mg

El producto tiene una proporción de cucurbitacina B: cucurbitacina D de 1.69:1.0

Ejemplo 15 - Formulación para administración rectal (2)

Se realizó una formulación rectal de la siguiente manera:

- 15 1. El extracto sólido como se describe en el ejemplo 1 se molió en un polvo fino,
2. Se agregó una cantidad apropiada de etanol al 50% y Tween-80 y la mezcla se agitó completamente,
3. Se tomó una cantidad de glicéridos semisintéticos apropiados para formar supositorios de dosificación unitaria (1.5 g) que contenían una dosis deseada de extracto (60 mg) y se fundieron en un baño de agua a 40 °C,
4. La solución y el polvo se mezclaron y se agitaron a fondo,
- 20 5. La solución resultante se vertió en un molde y se enfrió.

El supositorio rectal resultante contenía 60 mg de extracto estandarizado contra ya sea cucurbitacina D 0.37 mg y/o cucurbitacina B 0.59 mg

El producto tiene una proporción de cucurbitacina B: cucurbitacina D de 1.62: 1.0

Ejemplo 16 - Formulación para administración rectal (3)

Se realizó una formulación rectal de la siguiente manera:

- 25 1. El extracto sólido como se describe en el ejemplo 3 se molió en un polvo fino,
2. Una cantidad apropiada de manteca de cacao y poloxámero (Pluronic) se fundieron en un baño de agua a 40 °C,
3. La solución se mezcló con el polvo y se agitó a fondo.
4. La solución se vertió en un molde y se dejó enfriar.

El supositorio rectal resultante (1.5 g) contenía 20 mg de extracto estandarizado contra ya sea cucurbitacina D 0.10 mg y/o cucurbitacina B 0.17 mg

El producto tiene una proporción de cucurbitacina B: cucurbitacina D de 1.71:1.0

Ejemplo 17 - Formulación para administración rectal (4)

- 5 Se realizó una formulación rectal de la siguiente manera:
1. Tomar el extracto sólido como se describe en el ejemplo 8 y moler en un polvo fino,
 2. Tomar una cantidad apropiada de glicéridos semisintéticos y poloxámero (Pluronic) y fundirlos en un baño de agua a 40 °C,
 3. Mezclar la solución con el polvo y agitar muy bien,
 - 10 4. Verter la solución en un molde y enfriar.

El supositorio rectal resultante (1.2 g) contenía 15 mg de extracto estandarizado contra ya sea cucurbitacina D 3.74 mg y/o cucurbitacina B 4.60 mg

El producto tiene una proporción de cucurbitacina B: cucurbitacina D de 1.23:1.0

Ejemplo 18 - Formulación para administración rectal (5)

- 15 Se realizó una formulación rectal de la siguiente manera:
1. Tomar el extracto sólido como se describe en el ejemplo 6 y pulverizarlo,
 2. Fundir una cantidad apropiada de aceite de grano de hoja de especia (*Lindera communis Hems*) y Tween -80 a 40 °C en un baño de agua.
 3. Agregar el polvo a la solución y agitar muy bien,
 - 20 4. Verter la mezcla en el molde y enfriar.

El supositorio rectal resultante (1.0 g) contenía 50 mg de extracto estandarizado contra cucurbitacina D 0.29 mg y/o cucurbitacina B 0.31 mg

El producto tiene una proporción de cucurbitacina B: cucurbitacina D de 1.07: 1.0

Parte 3 - Evidencia de actividad reivindicada

- 25 En la siguiente sección se usó un extracto sólido como se describe en el ejemplo 1 y para la conveniencia de comprender, la proporción de la relación K de la dosis diaria por kg de peso corporal entre diferentes especies se da en la tabla a continuación.

	humano	rata	conejo	ratones
K	0.11	0.71	0.37	1

Experimento 1 - Prueba de dosis máxima tolerable

- 30 Este experimento se realizó para determinar la dosis máxima tolerable (MTD), por administración rectal, de un extracto del tipo descrito en los ejemplos 1.

- 35 En este experimento, se usaron ratas SD 10 macho y 10 hembras con un peso de 200-240 g. Estuvieron en ayunas durante 20 horas antes del experimento. Las ratas recibieron administraciones rectales del extracto de base de melón (diluido con solución salina a una concentración del 40%) a la dosis de 153 mg/kg/d. Se registraron las reacciones de las ratas, incluido el comportamiento, el movimiento de las extremidades, la ingesta de agua y alimentos, la orina y las heces. La investigación duró 14 días continuos.

- 40 La mayoría de los animales produjeron heces acuosas con moco entre 30 y 120 minutos después de la medicación, y heces normales 6-8 horas después de la medicación. Algunos animales se acurrucaron con poco movimiento en la etapa inicial después de la medicación, pero volvieron a la actividad normal después de 30 minutos. Todos los animales crecieron normalmente sin que ocurriera la muerte en un período de observación de 14 días. No hubo signos evidentes de toxicidad y no se encontraron anomalías en los órganos.

La dosis máxima del extracto, por administración rectal, fue de 153 mg/kg/día, que es más de 200 veces la dosis clínica recomendada en humanos. Indicó que el extracto tiene un buen perfil de seguridad cuando se administra como una dosis única y es una guía para un uso clínico seguro.

Experimento 2 - Prueba de irritación de la mucosa rectal

5 El extracto sólido como se describe en el ejemplo 1 se administró continuamente a conejos a dosis altas y bajas durante 7 días.

Los animales a dosis bajas (4.64 mg/kg) no mostraron signos evidentes de irritación de la mucosa rectal y esta dosis fue equivalente a 7.14 veces la dosis clínica humana recomendada de 0.65 mg.

10 Los animales en la dosis alta (18.55 mg/kg) mostraron una ligera irritación en la mucosa rectal pero fue reversible y esta dosis fue equivalente a 28.5 veces la dosis clínica humana recomendada de 0.65 mg.

El resultado experimental sugirió que el extracto no sería irritante cuando se administra a humanos como una dosis única de 0.65 mg/kg/día.

Experimento 3 - Estudio de promoción de excreción

15 En este experimento, 50 ratones ICR machos que pesaban 23-27 g respectivamente se dividieron aleatoriamente en 5 grupos con 10 por grupo, esto es, control normal, control positivo y tres grupos de dosis a 2.48 mg/kg, 4.96 mg/kg y 9.92 mg./kg, respectivamente. Estuvieron en ayunas durante 24 horas antes del experimento.

20 Los ratones en el grupo de control positivo recibieron una inyección de 0.1 ml/10 g de peso corporal de neostigmina hipodérmicamente, mientras que los ratones en los grupos de control normales recibieron administraciones rectales de solución salina de 0.02 ml/10 g de peso corporal. Los ratones en los tres grupos de dosis recibieron administraciones rectales del extracto de base de melón (diluido con solución salina para dar las dosis deseadas y recibieron 0.02 ml/10 g de peso corporal).

25 Después de la medicación, todos los ratones recibieron infusiones intragástricamente de tinta india (10% de tinta, diluida con solución salina, a la dosis de 0.02 ml/10 g de peso corporal). Los ratones se pusieron individualmente en una jaula con piso de papel de filtro de color blanco. El tiempo de excreción y la cantidad de heces se registraron durante períodos de observación de 4 horas.

En comparación con el grupo de control normal, y mediante el uso de análisis estadístico, la duración de la primera excreción de heces negras de los ratones en el grupo de control positivo y tres grupos de dosis se redujo en un 53%, 34%, 39% y 49% ($p < 0.01$), respectivamente. La cantidad de heces del grupo de control positivo y tres grupos de dosis se incrementaron en un 49% ($p < 0.01$), 19% ($p < 0.05$), 29% ($p < 0.01$) y 49% ($p < 0.01$), respectivamente.

30 Los resultados sugirieron que los extractos en las tres dosis podían promover claramente la excreción en ratones normales y el efecto era dependiente de la dosis.

Experimento 4 - Estudio sobre el impulso del intestino delgado

35 En este experimento, 50 ratones ICR machos con un peso de 23-27 g respectivamente se dividieron aleatoriamente en 5 grupos con 10 por grupo, esto es, control normal, control positivo y tres grupos de dosis a 2.48 mg/kg, 4.96 mg/kg y 9.92 mg/kg, respectivamente. Estuvieron en ayunas durante 24 horas antes del experimento. Los ratones en el grupo de control positivo recibieron una inyección de 0.1 ml/10 g de peso corporal de neostigmina hipodérmicamente, mientras que los ratones en grupos de control normales recibieron administraciones rectales de solución salina de 0.02 ml/10 g de peso corporal. Los ratones en tres grupos de dosis recibieron administraciones rectales del extracto de base de melón (diluido con solución salina a las dosis deseadas y recibieron 0.02 ml/10 g de peso corporal). Veinte minutos después de la medicación, se administró tinta India al 10% (diluida con solución salina) a cada ratón a la dosis de 0.2 ml/10 g de peso corporal.

Los ratones fueron sacrificados en 15 minutos y se realizó la laparotomía. Se extrajo y midió la sección del intestino delgado desde el píloro hasta la unión ileocólica. El porcentaje de impulso se calculó midiendo la longitud total del intestino delgado y la distancia entre el píloro y el frente de la tinta impulsada. (Véase la figura 3 para el resultado).

45 Los dos grupos de dosis (dosis intermedia y alta) mostraron claramente un efecto impulsor del intestino delgado en el experimento ($p < 0.01$) en comparación con el grupo de control normal.

Experimento 5 - Estudio sobre el impulso del intestino grueso

Este es un estudio de eficacia sobre el movimiento del intestino grueso en ratas normales después de la administración rectal del producto.

50 El resultado experimental mostró que el extracto de la invención promueve un impulso significativo del intestino grueso en ratas.

En el experimento, 50 ratas Wistar machos que pesaban 200-250 g respectivamente se dividieron aleatoriamente en 5 grupos con 10 por grupo. Estuvieron en ayunas durante 24 horas antes del experimento. Las ratas fueron eterizadas en posición supina. Se realizó una incisión en la línea media (1.5-2 cm) a nivel del hipogastrio y se extrajo delicadamente la unión ileocólica con unas pinzas. Se inyectó en el colon tinta de India al 10% a 0.2 ml/100 g de peso corporal con extracto de base de melón a la dosis de 1.5 mg/kg, 3.0 mg/kg o 6.0 mg/kg con una jeringa. Las ratas en el control normal y los grupos de control positivo recibieron inyecciones de solución salina y tinta al 10%. Las ratas en control positivo también recibieron inyección de neostigmina (0.08 mg/kg). La incisión se cosió inmediatamente después de las inyecciones y se inició un recuento de tiempo. Las ratas fueron sacrificadas y la laparotomía se realizó 40 minutos después de la medicación. Se extrajo el intestino grueso desde el apéndice hasta el ano. La longitud total del intestino se midió desde el inicio del colon hasta el ano. También se midió la distancia del impulso de tinta desde el inicio del colon hasta el frente de tinta. Se calculó el porcentaje de impulso (Figura 4).

En comparación con el grupo de control normal, el extracto a tres niveles de dosis mostró un notable efecto impulsor sobre el intestino grueso en ratas ($p < 0.01$). Se observó alguna relación dosis-efecto.

Experimento 6 - Experimento de vaciado gástrico

En el experimento, 60 ratones ICR machos con un peso de 22-26 g respectivamente se dividieron aleatoriamente en 5 grupos con 12 por grupo, esto es, control normal, control positivo y tres grupos de dosis, respectivamente. Estuvieron en ayunas durante 24 horas antes del experimento. Los ratones en el grupo de control positivo recibieron una inyección de 0.15 ml/10 g de peso corporal de neostigmina hipodérmica, mientras que los ratones en los grupos de control normales recibieron administraciones rectales de solución salina. Los ratones en tres grupos de dosis recibieron administraciones rectales del extracto de base de melón a 2.48 mg/kg, 4.96 mg/kg y 9.92 mg/kg, respectivamente.

Se administró una suspensión de 2% de carboximetilcelulosa con rojo de fenol al 0.05% como infusión gástrica a todos los ratones (0.4 ml/ratón) 30 minutos después de la medicación. Los ratones fueron sacrificados y la laparotomía se realizó en 15 minutos. Ambos extremos del estómago se ataron y todo el estómago, incluido el contenido gástrico, se cortó en pedazos y se remojó en 8 ml de solución de NaOH 1 mol/L durante 2 horas. Se centrifugó a 3000r/min durante 5 minutos. Se tomaron 2.5 ml del líquido sobrenadante y se agregaron 2.5 ml de ácido tricloroacético al 10% para precipitación con albúmina. Se centrifugó nuevamente a 3000 r/min durante 15 minutos y se tomó el líquido sobrenadante y se analizó con un espectrofotómetro a 546 nm.

El porcentaje de vaciado gástrico se calculó usando la siguiente fórmula y los resultados se compararon con los del grupo de control normal.

$$\text{Porcentaje de vaciado gástrico (Se)} = 100 - \frac{Ps}{Pa} \times 100$$

Ps = concentración de rojo fenol en el estómago del ratón (ug/ml)

Pa = concentración de rojo fenol después de agregar el mismo volumen de 1 mol/L de NaOH y ácido tricloroacético (ug/ml) en la solución de extracto original

En comparación con el grupo de control normal (como se muestra en la figura 5), el grupo de dosis alta ($p < 0.01$) y el grupo de dosis intermedia ($p < 0.05$) mostraron un efecto promotor del vaciado gástrico con ciertas características dependientes de la dosis.

Experimento 7 - Estudio sobre enterocinesia intestinal en ratones con lesión mecánica.

En este experimento, 72 ratones ICR machos con un peso de 22-26 g cada uno se dividieron aleatoriamente en 6 grupos con 12 por grupo. Fueron nombrados como el grupo de pseudooperación, el grupo modelo, el grupo de control positivo (usando neostigmina) y 3 grupos de dosis (dosis baja, intermedia y alta). Los ratones estuvieron en ayunas durante 24 horas antes del experimento. Los ratones en el grupo de pseudooperación fueron eterizados y se hizo un agujero en cada uno de sus abdómenes que se cosieron inmediatamente después de la incisión. Los ratones en los otros grupos también fueron eterizados y se hizo un agujero en cada uno de sus abdómenes. Luego, se insertó un objeto como medio curvado en el orificio y se giró 5 vueltas en sentido antihorario para hacer una lesión mecánica simulada y luego se cosió el orificio. Después de la cirugía, se administraron soluciones rectales de solución salina (0.02 ml/10 g de peso corporal) al grupo de pseudooperación y al grupo modelo, y se administraron inyecciones de neostigmina (0.15 mg/kg) al grupo de control positivo a la dosis de 0.1 ml/10 g de peso corporal. Los 3 grupos de dosis recibieron diferentes dosis del extracto de base de melón a las dosis de 2.48 mg/kg, 4.96 mg/kg y 9.92 mg/kg (diluido con solución salina), respectivamente.

Después de la medicación, se administró a los ratones la administración intragástrica de tinta al 10% a la dosis de 0.2 ml/10 g de peso corporal. Los ratones fueron sacrificados y la laparotomía se realizó en 140 minutos. Se extrajo el intestino desde el píloro hasta el ano para calcular el porcentaje de impulso midiendo la longitud total del tracto alimentario y la distancia del píloro al frente de la tinta impulsada (véase la figura 6).

Como se muestra en la figura 6, el extracto en los tres grupos de dosis podría promover significativamente la enterocinesia intestinal en ratones con lesiones mecánicas causadas por cirugía ($p < 0.01$), lo que indica que el extracto podría promover significativamente la recuperación de la enterocinesia en ratones de prueba.

5 Experimento 8 - Estudio sobre la enterocinesia intestinal en ratones con hipofunción gastrointestinal inducida por atropina

En este experimento, 66 ratones ICR machos que pesaban 22-26 g respectivamente se dividieron aleatoriamente en 6 grupos con 11 por grupo. Estuvieron en ayunas durante 24 horas antes del experimento. Los 6 grupos fueron nombrados como:

- Grupo de control normal,
- 10 • Grupo modelo,
- Grupo de control positivo, y
- Los tres grupos de dosis.

A los ratones en el grupo de control normal solo se les inyectó solución salina a 0.1 ml/10 g y a los ratones en todos los demás grupos se les inyectaron 0.25 mg/kg de atropina hipodérmica a 0.1 ml/10 g de peso corporal.

15 Veinte minutos después de la inyección, se administró extracto de base de melón (diluido con la solución salina) a los ratones a las dosis de 2.48, 4.96 y 9.96 mg/kg mediante administración rectal y se administró solución salina a los ratones en condiciones normales, control y los grupos modelo. Se administró inyección hipodérmica de neostigmina (0.15 mg/kg) a los ratones en el grupo de control positivo a la dosis de 0.1 ml/10 g de peso corporal. 20 minutos más tarde, se administró una administración intragástrica de tinta al 10% a todos los ratones a la dosis de 0.2 ml/10 g de peso corporal.

Todos los ratones fueron sacrificados y laparotomizados en 90 minutos. Se extrajo el intestino desde el píloro hasta el ano para medir toda la longitud del tracto alimentario. Se midió la distancia desde el píloro hasta el frente de la tinta impulsada para calcular el porcentaje de impulso.

25 Como se muestra en la figura 7, el extracto de base de melón en las tres dosis podría promover la enterocinesia intestinal en ratones con hipofunción gastrointestinal inducida por atropina ($p < 0.01$), lo que indica que el extracto podría promover la recuperación de los animales hipofuncionales. El efecto en el grupo de dosis alta fue similar al de neostigmina pero sin ningún efecto secundario obvio de espasmo muscular que siempre se encontró en todos los ratones en el grupo de control positivo.

Experimento 9 - Estudio sobre los intervalos de excreción y la cantidad de heces.

30 En este experimento, 66 ratones ICR machos que pesaban 22-26 g respectivamente se dividieron aleatoriamente en 6 grupos con 11 por grupo. Estuvieron en ayunas durante 24 horas antes del experimento.

Los 6 grupos fueron nombrados como:

- Grupo de control normal,
- Grupo modelo,
- 35 • Grupo de control positivo, y
- Los tres grupos de dosis.

A los ratones en el grupo de control normal solo se les inyectó solución salina a 0.1 ml/10 g y a los ratones en todos los demás grupos se les inyectaron 0.25 mg/kg de atropina hipodérmica a 0.1 ml/10 g de peso corporal.

40 Veinte minutos después de la inyección, se administró extracto de base de melón (diluido con la solución salina) a los ratones a las dosis de 2.48, 4.96 y 9.96 mg/kg mediante administración rectal y se administró solución salina a los ratones en control normal y los grupos de modelo. Se administró inyección hipodérmica de neostigmina (0.15 mg/kg) a los ratones en el grupo de control positivo a la dosis de 0.1 ml/10 g de peso corporal.

45 20 minutos más tarde, se administró una administración intragástrica de tinta al 10% a todos los ratones a la dosis de 0.2 ml/10 g de peso corporal. Luego cada ratón fue enjaulado individualmente en una caja con papel de filtro de color blanco en el piso. La cantidad de heces y el tiempo de excreción se registraron durante períodos de observación de 4 horas.

En comparación con el grupo modelo, el extracto con cucurbitacinas totales en dosis baja ($p < 0.05$), intermedia ($p < 0.01$) y dosis alta ($p < 0.01$) redujo significativamente los intervalos de excreción en ratones con hipofunción gastrointestinal y

también aumentó la cantidad de heces de los ratones (dentro de un período de 4 horas). Demostró que el extracto puede activar la restauración de enterocinesia intestinal en ratones con hipofunción gastrointestinal inducida por atropina.

Experimento 10 - Estudio sobre constricción de colon proximal en ratas anestesiadas.

- 5 En el experimento, 30 ratas Wistar machos que pesaban 300-350 g respectivamente estuvieron en ayunas durante 24 horas antes del experimento. Las ratas se anestesiaron con carbamato de etilo al 10% en posición supina sobre una mesa de operaciones con aislamiento térmico. Se cortó el pelo del abdomen medio y se realizó una incisión en la línea media (5-6 cm) a nivel del hipogastrio. El colon y la unión ileocólica se levantaron delicadamente con unas pinzas y se seleccionó un segmento de colon de aproximadamente 2 cm de la unión ileocólica. Ambos extremos del segmento (el tracto ipsilateral del colon) estaban conectados por una sutura a una lámina de tubo fija. Se usó otra sutura más larga, con un extremo conectado a la pared del colon, mientras que el otro extremo, a través del tubo, se conectó a un Transductor de tensión muscular JZ100 (carga 2.0 g). El segmento de colon se volvió a colocar en la cavidad abdominal y se suturó la incisión con el tubo sobresaliendo de la pared abdominal para evitar que el segmento de colon se deslizará. Una pieza de gasa saturada con solución de cloruro de sodio al 0.9% se cubrió en la incisión. Después de la cirugía, se conectó el sistema de electrofisiología RM6240 para registrar un enterograma.

Después de que la enterocinesia volviera a la normalidad, se comenzó a registrar un enterograma. La administración rectal de extracto de base de melón se administró a la dosis de 3.05 mg/kg y 6.10 mg/kg, respectivamente, y el enterograma se registró durante 2 horas más. Se calcularon los siguientes:

- El número de ondas de contracción cada 30 minutos (Figura 8)
- 20 • Índice de amplitud en cada 30 minutos, esto es, amplitud total de todas las ondas de contracción en 30 minutos (Figura 10)
- El porcentaje del cambio de la onda de contracción (100% establecido como antes de la medicación). Se calcula de la siguiente manera: el número de ondas de contracción en 30 minutos después de la medicación: el número de ondas de contracción en 30 minutos antes de la medicación/el número de ondas de contracción en 30 minutos antes de la medicación x 100% (Figura 9)
- 25 • La tasa porcentual del cambio de los índices de amplitud (100% establecido como antes de la medicación).

Se calcula de la siguiente manera: índice de amplitud en 30 minutos después de la medicación - índice de amplitud en 30 minutos antes de la medicación)/índice de amplitud en 30 minutos antes de la medicación x 100%. (Figura 11)

A partir de los datos resultantes (Figuras. 8-11), el extracto de base de melón a dosis bajas y altas podría:

- 30 • Aumentar el movimiento proximal del colon en ratas anestesiadas.
- Aumentó significativamente
- Ondas de contracción,
 - Los índices de amplitud,
 - El porcentaje de números de contracción, y
 - 35 • El porcentaje del índice de amplitud en 30 minutos. El efecto alcanzó un pico entre 30 minutos y 60 minutos. También se observó una relación dosis-efecto.

Experimento 11 - Estudio sobre vaciado gástrico

En este experimento, 60 ratones ICR machos con un peso de 22-26 g respectivamente se dividieron en 6 grupos con 10 por grupo. Estuvieron en ayunas durante 24 horas antes del experimento.

- 40 Los 6 grupos incluyeron:
- Un grupo de control normal,
 - Un grupo modelo,
 - Un grupo de control positivo (usando neostigmina), y
 - Tres grupos de dosis.
- 45 Los ratones en el grupo de control normal recibieron inyecciones de solución salina mientras que los ratones en los otros 5 grupos recibieron 0.3 mg/kg de inyecciones hipodérmicas de atropina.

Las administraciones rectales de solución salina se administraron al control normal y al grupo modelo. El extracto de base de melón (diluido con solución salina) se administró a los ratones en grupos de dosis a 2.48 mg, 4.96 mg y 9.96 mg/kg, respectivamente.

Los ratones de control positivo recibieron inyecciones hipodérmicas de neostigmina (0.15 mg/kg).

- 5 La administración intragástrica de rojo de fenol al 0.05% y carboximetilcelulosa al 2% se administró a todos los ratones a 0.4 ml por ratón 30 minutos después de la medicación. Después de 40 minutos, los ratones fueron sacrificados y laparotomizados. Ambos extremos del estómago se ataron y todo el estómago, incluido el contenido gástrico, se cortó en pedazos y se remojó en 8 ml de solución de NaOH 1 mol/L durante 2 horas. Luego se centrifugó a 3000 r/min durante 5 minutos y se tomaron 2.5 ml del líquido sobrenadante. Se agregaron 2.5 ml de ácido tricloroacético al 10% para precipitación con albúmina y la solución se centrifugó nuevamente a 3000 r/min durante 15 minutos. El líquido sobrenadante se tomó y analizó con un espectrofotómetro a 546 nm. El porcentaje de vaciado gástrico se calculó mediante la siguiente fórmula.

$$\text{Porcentaje de vaciado gástrico (Se)} = 100 - \text{Ps} * \text{Pa} - 1 * 100$$

Ps = concentración de rojo fenol en el estómago del ratón (ug/ml)

- 15 Pa = concentración de rojo fenol en la solución del extracto original más el mismo volumen de 1 mol/L de NaOH y ácido tricloroacético (ug/ml)

- 20 Como se muestra en la figura 12, el extracto con cucurbitacinas totales a la dosis alta (9.96 mg/kg) podría mejorar significativamente la función de vaciado gástrico de los ratones con hipofunción gastrointestinal inducida por atropina (P < 0.05). Las diferencias en los grupos de dosis bajas e intermedias no mostraron significancia (P > 0.05) en comparación con el grupo modelo, aunque mostró una tendencia hacia la promoción del efecto de vaciado gástrico.

Experimento 12 - Estudio sobre íleon de cobaya ex vivo (Figura 13)

En este experimento, se usaron cobayas hembras sanas, blancas, no embarazadas, con un peso corporal de entre 250-350 g. El extracto de base de melón se disolvió en una solución de cloruro de sodio al 0.9% a las concentraciones requeridas.

- 25 Se sacrificaron las cobayas después de 24 horas de ayuno; el íleon se eliminó rápidamente y se colocó en la solución de Tyrode saturada con 5% de CO₂. Después de un procedimiento de limpieza normal, se cortó a 1-2 cm y se colocó en un baño Magnus lleno con la solución de Tyrode para medir el movimiento muscular usando un registrador fisiológico de múltiples pistas RM6240.

- 30 Después de la preparación del íleon aislado, la tensión del íleon se ajustó para normalizar la contracción y se registró el movimiento normal usando un registrador fisiológico de múltiples pistas RM6240. Se agregaron 20 ml de solución de prueba que contenía 30 mg, 60 mg y 120 mg de extracto, respectivamente, y el movimiento se registró por separado. Antes de agregar las soluciones de prueba segunda y tercera, el íleon se lavó 2-3 veces con la solución de Tyrode de 37 grados C para normalizar el movimiento del íleon.

- 35 Como se muestra en la figura 13, el extracto mostró un efecto significativo sobre el aumento de la fuerza de contracción del íleon de cobaya aislado

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un extracto estandarizado de *Cucumis melo L.* estandarizado contra cucurbitacina D y/o cucurbitacina B, que comprende cucurbitacina D y cucurbitacina B en una proporción de cucurbitacina B: cucurbitacina D de 10:1 a 1:2 y en el que la cantidad de cucurbitacina D presente en el peso total de las cucurbitacinas, incluidas las isocucurbitacinas, comprende del 5% al 50%.
2. Un extracto estandarizado de *Cucumis melo L.* según la reivindicación 1 que comprende además al menos uno de los siguientes:
cucurbitacina A, cucurbitacina E, isocucurbitacina B e isocucurbitacina D.
- 10 3. Un extracto estandarizado de *Cucumis melo L.* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es un extracto completo de cucurbitacinas.
4. Un extracto estandarizado de *Cucumis melo L.* según la reivindicación 1 que tiene una proporción de cucurbitacina B: cucurbitacina D desde 3:1 a 1:1.
5. Un extracto estandarizado de *Cucumis melo L.* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se selecciona entre:
- 15 un extracto acuoso que ha experimentado una precipitación de alcohol y que tiene una huella digital de HPLC sustancialmente como se representa en la figura 2a con respecto a los compuestos cucurbitacina A (pico 1), cucurbitacina D (pico 2), isocucurbitacina D (pico 3), cucurbitacina B (pico 4), cucurbitacina E (pico 5) e isocucurbitacina B (pico 6);
- 20 un extracto acuoso que ha sufrido una precipitación de alcohol y que tiene una huella digital de HPLC sustancialmente como se representa en la figura 2c con respecto a los compuestos cucurbitacina A (pico 1), cucurbitacina D (pico 2), isocucurbitacina D (pico 3), cucurbitacina B (pico 4), cucurbitacina E (pico 5) e isocucurbitacina B (pico 6);
- un extracto acuoso purificado con cloroformo que tiene una huella digital de HPLC sustancialmente como se representa en la figura 2d con respecto a los compuestos cucurbitacina A (pico 1), cucurbitacina D (pico 2), isocucurbitacina D (pico 3), cucurbitacina B (pico 4), cucurbitacina E (pico 5) e isocucurbitacina B (pico 6);
- 25 un extracto alcohólico que tiene una huella digital de HPLC sustancialmente como se representa en la figura 2b con respecto a los compuestos cucurbitacina A (pico 1), cucurbitacina D (pico 2), isocucurbitacina D (pico 3), cucurbitacina B (pico 4), cucurbitacina E (pico 5) e isocucurbitacina B (pico 6); y
- un extracto purificado de resina que tiene una huella digital de HPLC sustancialmente como se representa en la figura 2e con respecto a los compuestos cucurbitacina A (pico 1), cucurbitacina D (pico 2), isocucurbitacina D (pico 3), cucurbitacina B (pico 4), cucurbitacina E (pico 5) e isocucurbitacina B (pico 6).
- 30 6. Una formulación farmacéutica en forma de dosificación unitaria que comprende un extracto estandarizado de *Cucumis melo L.* según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 6 que comprende cucurbitacina D en una cantidad para proporcionar una dosis diaria que contiene desde 0.0040 mg a 40 mg de cucurbitacina D.
- 35 8. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 7 que comprende cucurbitacina D en una cantidad para proporcionar una dosis diaria que contiene desde 0.1 mg a 1.6 mg de cucurbitacina D.
9. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 7 que comprende cucurbitacina B en una cantidad para proporcionar una dosis diaria que contiene desde 0.0064 a 64 mg de cucurbitacina B.
- 40 10. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 9 que comprende cucurbitacina B en una cantidad para proporcionar una dosis diaria que contiene desde 0.16 a 2.6 mg de cucurbitacina B.
11. Una formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 que tiene una proporción de cucurbitacina B: cucurbitacina D desde 3:1 a 1:1.
12. Una formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 que es para administración rectal.
13. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 12, que es un supositorio.
- 45 14. Un extracto estandarizado de *Cucumis melo L.* según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para uso en el tratamiento de, o para efectuar, una o más de las siguientes condiciones:
- Activación de la gastroenterocinesia;
 - Restauración de gastroenterocinesia postoperatoria;

- Reducción de la duración del flato postoperatorio;
 - Tratamientos de estreñimiento
 - Tratamiento de la adhesión intestinal postoperatoria;
 - Tratamiento de la adhesión intestinal y el íleo;
- 5
- Estimulante del movimiento gastrointestinal en no cirugía
 - Impulso del intestino grueso y delgado;
 - Activación del vaciado gástrico;
 - Suaviza el movimiento intestinal; y
 - Reducción de los intervalos de excreción y aumento de la cantidad de heces.

10

Fig 1a

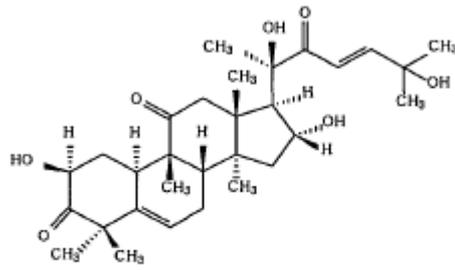


Fig 1b

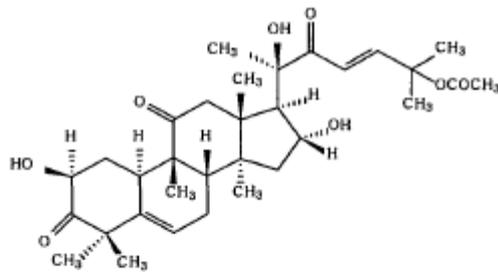


Fig 1c

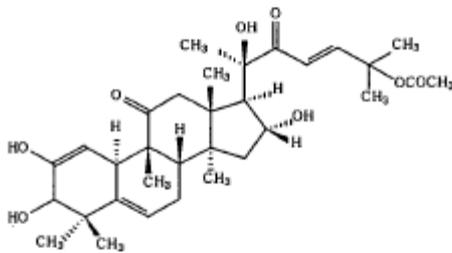


Fig 1d

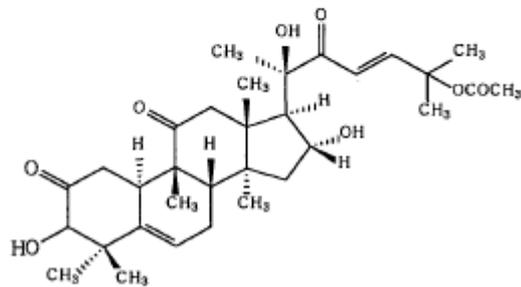


Fig 1e

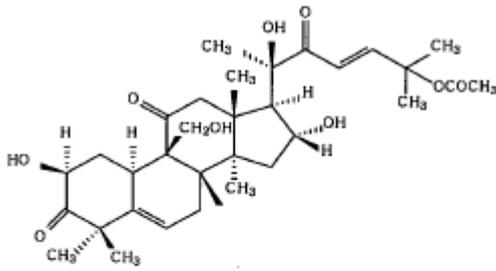


Fig 1f

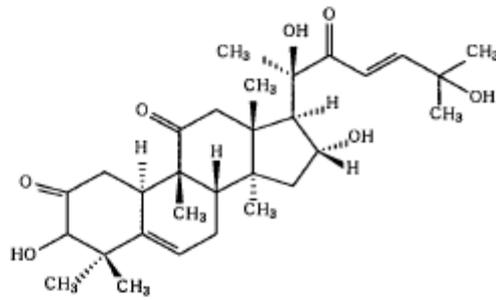


Fig 2a

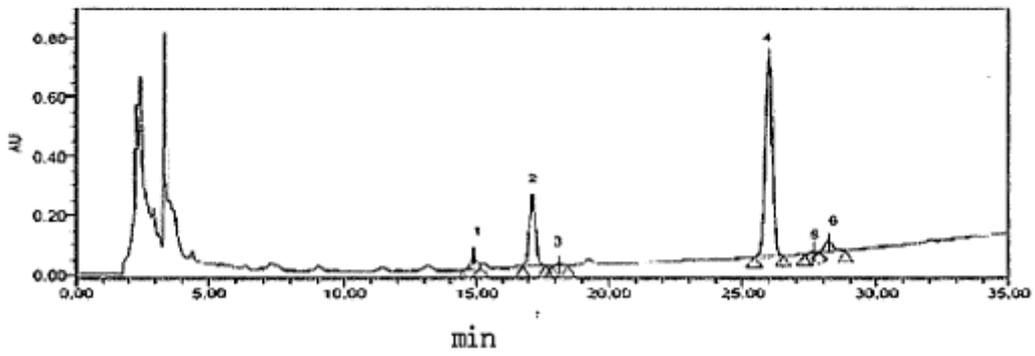


Fig 2b

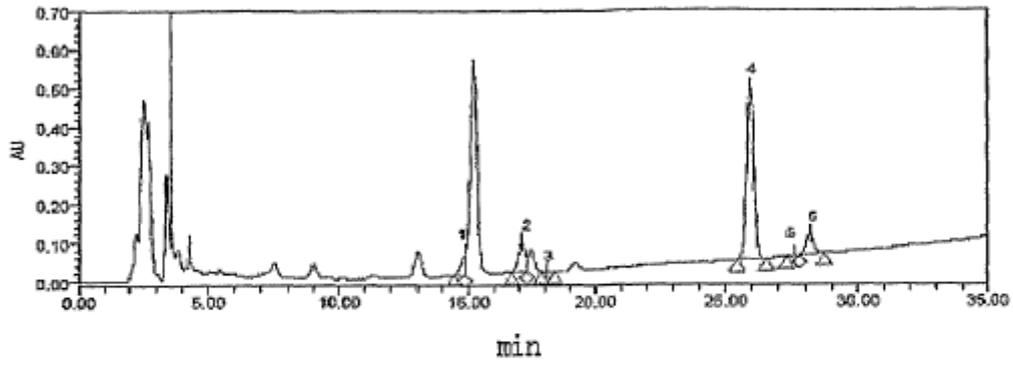


Fig 2c

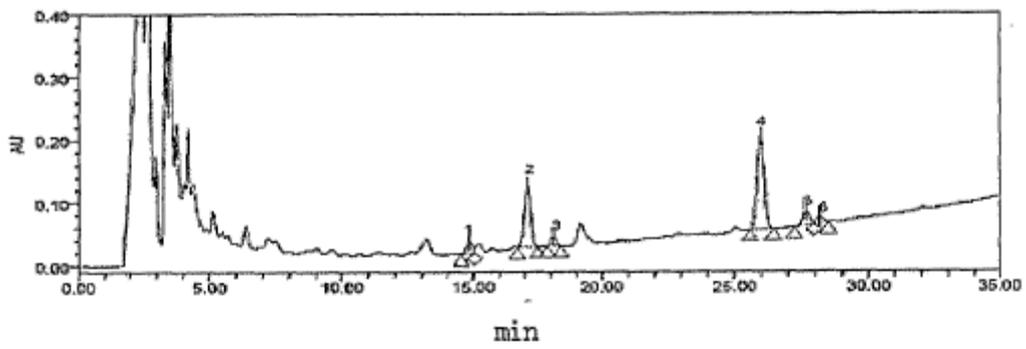


Fig 2d

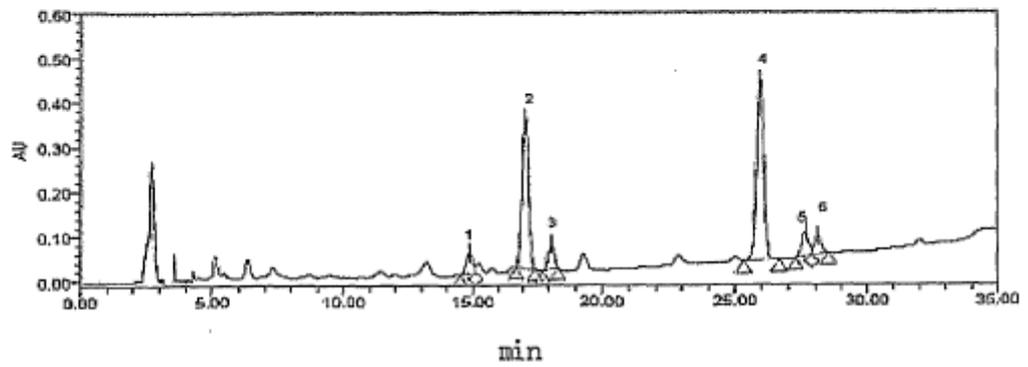


Fig 2e

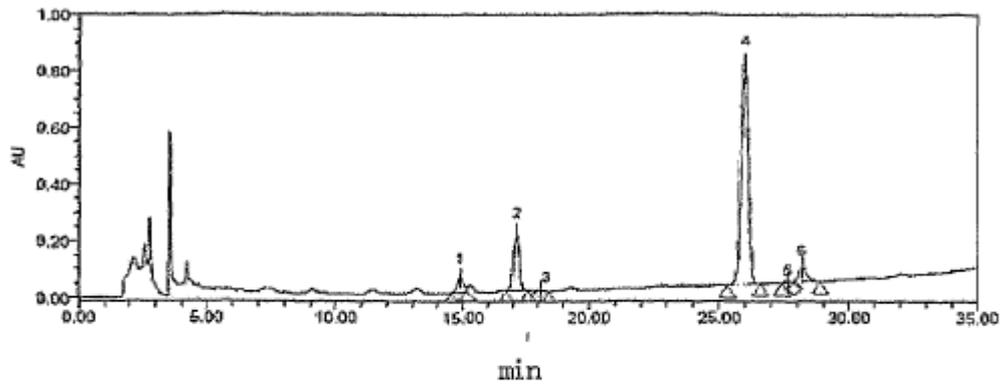


Fig 3

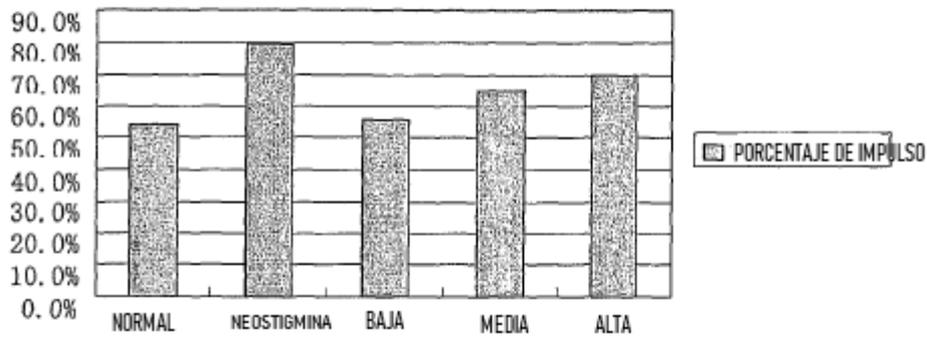


Fig 4

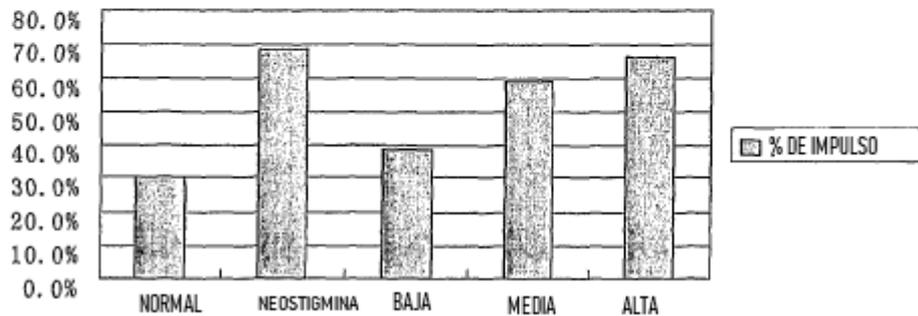


Fig 5

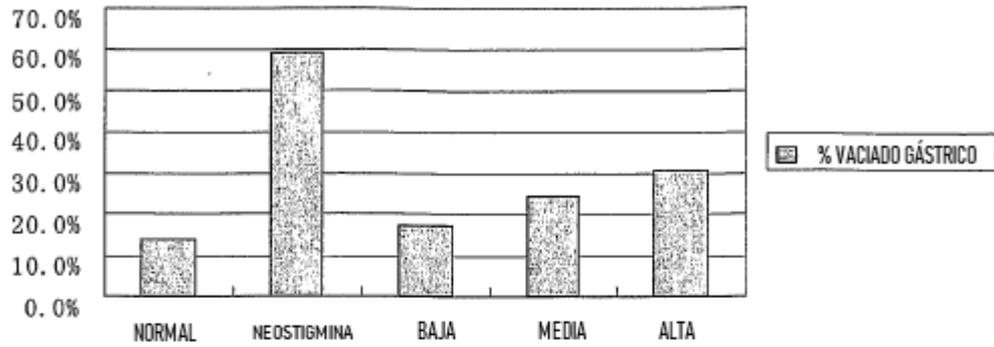


Fig 6

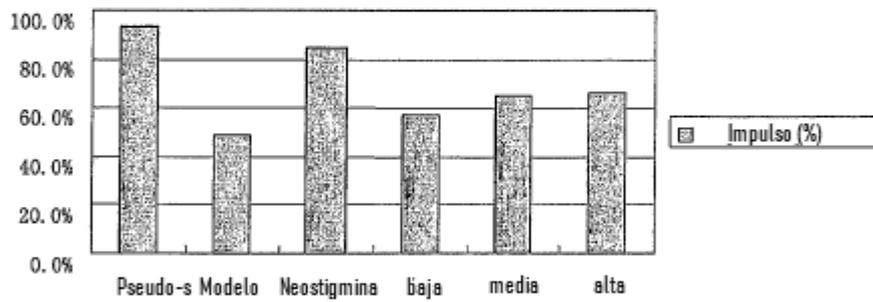


Fig 7

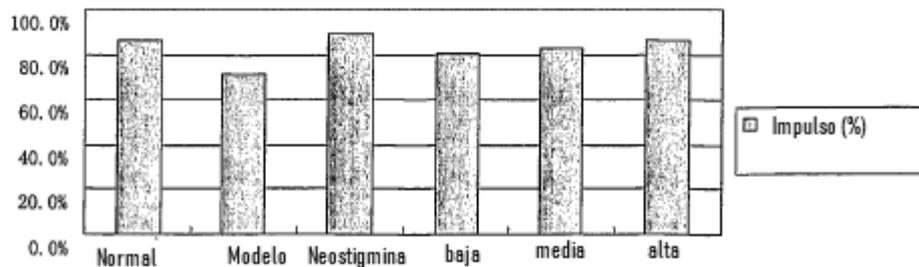


Fig 8

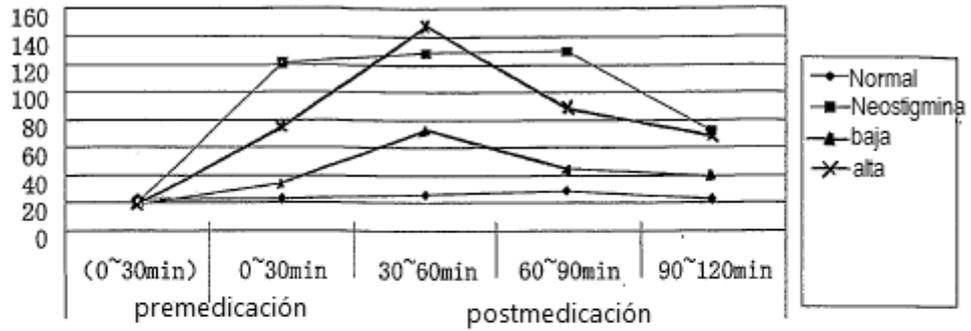


Fig 9

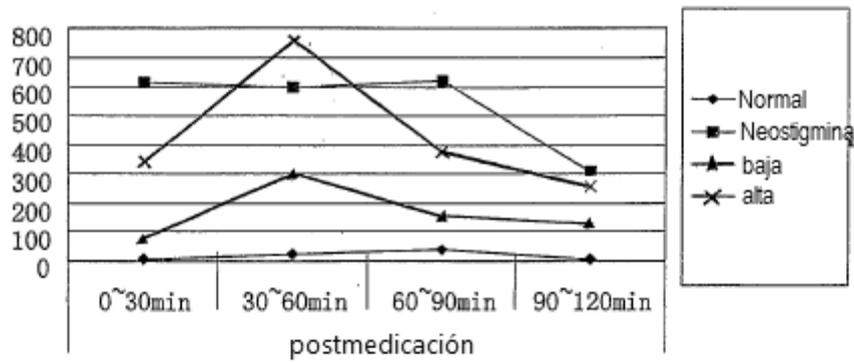
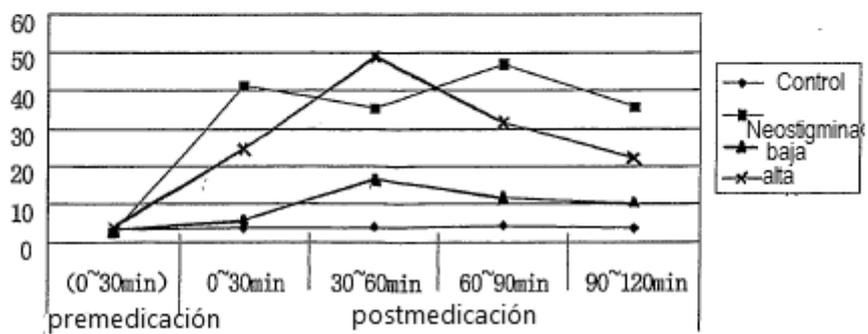


Fig 10



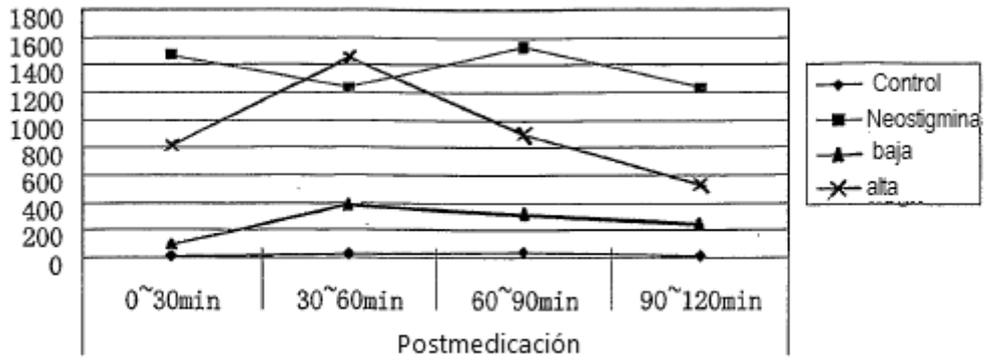


Fig 12

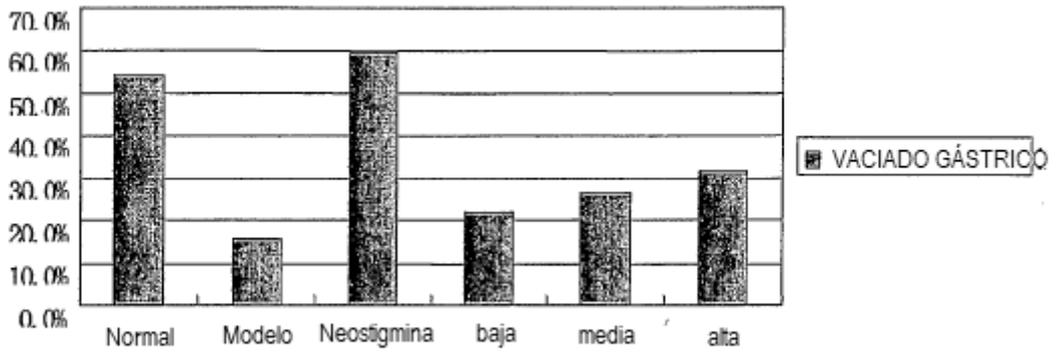


Fig 13

