



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 216**

51 Int. Cl.:  
**A61K 36/53** (2006.01)  
**A61P 33/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06796196 .1**  
96 Fecha de presentación : **30.08.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1931367**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2008**

54 Título: **Fracción de agua bioactiva proveniente de *Gomphostemma niveum*.**

30 Prioridad: **04.10.2005 IN DE2073/04**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.06.2011**

73 Titular/es: **The Director General, Defence Research & Development Organisation  
Ministry of Defence, Government of India  
West Block - 8, Wing-I, Sector-I,R.K  
Puram, New Dehli 110 066, IN**

72 Inventor/es: **Kumar, Sanjay;  
Thavaselvam, Duraipandian;  
Kaushik, Mahabir, Prashad;  
Gogoi, Hemant, Kumar;  
Sekhar, Krishnamurthy;  
Koch, Deba y  
Nivsarkar, Manisha**

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 362 216 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

## CAMPO DE INVENCION

5 [0001] La presente invención se refiere a una novedosa fracción de agua bioactiva obtenida de las hojas de una hierba de nombre *Gomphostemma niveum* encontrada comúnmente en la parte Noroeste de India, y la cual es útil para inhibir el crecimiento del parásito malarial de *Plasmodium falciparum*. La presente invención se refiere también a un método para la extracción de dicha fracción bioactiva. La presente invención también proporciona métodos para el uso de tales fracciones de agua bioactiva en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la malaria.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION Y TÉCNICA ANTERIOR

10 [0002] La malaria es la mas común entre las enfermedades transmitidas por insectos representando más de dos millones de muertes de los 400 millones de casos reportados cada año (Greenwood et. al., Nature 9415), 670(2002)) causadas por *Plasmodium falciparum*. (Depote et al. Trends in parasitology (20), 4, 165-198, (2004)). Más de la mitad de la población mundial vive en áreas donde continúan con riesgo de infección de la malaria (Sachs et al Nature, (415), 686 (2002). La derivación de importante compuesto antimalarial comenzó con el descubrimiento de polvo de corteza de cinchona (quinina)(Brooking, GB 106430, (1917)) en 1820. Posteriormente a la primera Guerra Mundial hubo un periodo de trabajo intenso para mantener tales registros etnobotánicos en los cuales el uso de la quinina ha permanecido como el medicamento de elección de la malaria. En 1940 otro medicamento antimalarial cloroquina (Ringwald et al, Boletín de la Organización Mundial de la Salud, 77(1), 34, (1999)) fue sintetizado y hasta recientemente fue el único medicamento usado para el tratamiento de la malaria. Desafortunadamente, después de un éxito inicial, el parásito malarial especialmente *P. falciparum* se volvió resistente a la cloroquina. El tratamiento de la malaria resistente a la cloroquina (White et al. Delaying anti-malarial drug resistance with combination chemotherapy Parasitologia, (41), 301-308, (1999)) fue hecho con medicamentos alternativos o combinación de medicamentos (Tulp et. al, Drug Discovery Today (9)450, (2004)) las cuales son bastante costosas y en ocasiones tóxicas. Además, estas combinaciones no siempre dependen del principio farmacocinético debido al conocimiento inadecuado del metabolismo y el mecanismo de acción de la mayoría de los medicamentos antimalariales. En los últimos años una medicamento antimalarial con base de una planta aislada de la planta china *Artemisinin annua* (Klayman, Science (228),1049,(1985)), Bharel et al. Fitoterapia, (67), 387-399, (1996)) probó ser muy activo contra *P. falciparum*. Sin embargo, el uso de Artemisinina, una lactona sesquiterpeno endoperóxido está de algún modo limitada a causa de su coste relativamente elevado, limitada producción de normas GMP y registros de toxicidad (Haynes et al. Curr. Opin. Infect. Dis, (14), 719-726, (2001)). La ruta actual para la síntesis total de Artemisinina (Qinghaosu) (US6, 710, 074 (2004) es demasiado compleja para la producción comercial (Schmid et al J. Am. Chem. Soc. (105), 624-625, (1983). Es actualmente preparada por medio de extracción a gran escala de *Artemisia annua* (warwood dulce)) y derivado tal como el artemetero, artesunato, arteéter y dihidroartemisinina, y están preparados semi sintéticamente a partir del extracto purificado. Además, se han encontrado dificultades en la producción de material de alta calidad (Haynes et al. Curr. Opin. Infect. Dis., (14), 719-726, (2001)).

35 [0003] De este modo, la resistencia extendida del parásito de la malaria a la mayoría de los medicamentos, necesita el desarrollo de un nuevo medicamento (Wiesner et al. Angew. Chem. Int. Ed. (42), 5274-5293, (2003)) el cual debería ser estructuralmente diferente de los compuestos típicos con mecanismo de acción novedosa para superar el problema de resistencia. Recientemente Ihara et. al revelaron sobre compuestos teniendo actividad antimalarial (US6,710,074 (2002)) provenientes de la síntesis. En el pasado reciente se ha informado también que diferentes clases de compuesto tienen actividad antimalarial como trioxane sustituido 1, 2, 4 (US 6,737,438(2002)), flavonoides (WO2004000306 (2003)), naftilisoquinolina (US6,627,641(2003)), indoloquinazolas (US6,531,487(2003)), trioxolanos (US6,486,199(2002)), alcaloides de betacarbolina (US6,143,756(2000)), vocamina (WO 9948501(1999)), derivados de acetilglucosalina (DE3220426(1983)) y así sucesivamente. Recientemente muchas patentes como US6,710,074, WO2004000319, US5,264,726, US2003212098, WO2004000306, EP1076057, WO9948501, US5,290,553, US6,143,756 y US6,627,641 revelaron compuestos teniendo actividad anti *Plasmodium falciparum* de plantas principalmente de origen natural. De ahí el enfoque etnofarmacológico para la búsqueda de nuevos antimalariales ha probado ser más predictivo.

50 [0004] Como parte de programas de investigación continuos sobre biorecursos, hemos sometido a una investigación de antecedentes a gran número de plantas procedentes de la región noreste para los estudios de inhibición antimalarial. La selección de plantas estuvo principalmente basado en varios criterios tal como los datos quimiotaxonómicos, observación de campo y recolección al azar.

55 [0005] La malaria está causada por protozoarios del género Plasmodium. A causa de su predominio, virulencia y resistencia al medicamento, es la enfermedad parasitaria más seria y extendida encontrada por el ser humano. El arsenal inadecuado de medicamentos en uso extendido para el tratamiento de la malaria y la falta de nuevos medicamentos asequibles son los factores limitadores en la lucha contra la malaria, la cual subraya la necesidad continuada de investigación para el desarrollo de nuevos medicamentos.

[0006] Por consiguiente existe una necesidad de desarrollar nuevos compuestos activos como una alternativa a la cloroquina y especialmente de la artemisinina, un medicamento antimalarial con base en planta aislado de la planta china *Artemisia annua*. La necesidad urgente es investigar el origen natural con un nuevo enfoque etnofarmacológico

5 para la búsqueda de nuevos antimalariales especialmente de la parte Noreste de India, lo cual no ha sido investigado hasta el momento. Otra necesidad es desarrollar un método adecuado para la extracción, aislamiento e identificación de principios bioactivos del extracto de planta teniendo propiedades antimalariales. Las nuevas técnicas recientemente desarrolladas de aislamiento y caracterización junto con el desarrollo de nuevas pruebas farmacológicas han llevado al interés en las plantas como una fuente de nuevos medicamentos. Sin embargo, un enfoque prometedor se necesita para usar esos agentes como plantillas para diseñar nuevos derivados con propiedades mejoradas.

#### OBJETOS DE LA PRESENTE INVENCION

- [0007] El principal objetivo de la invención es desarrollar un agente novedoso antimalarial inhibiendo el crecimiento del parásito malarial resistente a la cloroquina y sensible a la cloroquina de origen natural.
- 10 [0008] Otro objetivo de la invención es investigar las propiedades antimalariales de la planta medicinal india procedente de la región Noreste de India para el tratamiento de la malaria (la selección de la planta esta basada en datos quimiotaxonómicos).
- [0009] Un objetivo más particular es desarrollar un método sencillo y eficaz para la extracción, aislamiento e identificación de los componentes activos procedentes de las plantas medicinales indias.
- 15 [0010] Otro objetivo más es realizar un bioensayo in vitro de extractos crudos contra el crecimiento del parásito malarial.
- [0011] Otro objetivo adicional del invento es desarrollar un método HPLC de toma de huella reproducible para la supervisión rutinaria del extracto crudo.
- 20 [0012] Otro objetivo más de la invención es proporcionar una técnica adecuada para la identificación, evaluación y seguimiento de actividad antimalarial in vitro.
- [0013] Otro objetivo de la invención es realizar los estudios de estabilidad de temperatura para los diferentes extractos crudos, será útil para el almacenamiento de fracción bioactiva.
- [0014] Otro objetivo más es evaluar las diferentes rutas de administración y establecer su estabilidad en fluidos del cuerpo, la toxicidad y la capacidad para alcanzar el tejido infectado en una concentración adecuada durante análisis in vivo.
- 25

#### DECLARACION DE INVENCION

- [0015] La presente invención por lo tanto proporciona una novedosa fracción de agua bioactiva obtenida de las hojas de *Gomphostemma niveum*.
- 30 [0016] La presente invención también proporciona un método para la preparación de una fracción novedosa bioactiva de *Gomphostemma niveum* comprendiendo hojas de planta secas al aire, convirtiendo en polvo las hojas secadas al aire y sometiendo el polvo a extracción con agua filtrando el extracto y concentrandolo hasta sequedad bajo fracción reducida para obtener el extracto de agua bioactiva.
- [0017] En una realización de la invención, la extracción de agua se hace tres veces. En otra realización de la invención la extracción es llevada a cabo por el metodo de extracción de Soxhlet a temperatura de reflujo durante ocho horas.
- 35 [0018] En otra realización más de la invención, la extracción es llevada a cabo usando agua triplemente destilada.
- [0019] En otra realización más de la invención, el extracto filtrado es concentrado hasta el secado bajo presión reducida de alrededor de 86 libras por pulgada cuadrada a una temperatura de alrededor de 46°C usando un evaporador giratorio.
- 40 [0020] En otra realización de la invención, el extracto de agua obtenido es adicionalmente fraccionado por extracción líquido-líquido usando disolventes seleccionados de un grupo constando de hexano, éter dietílico, cloroformo y etanol sobre la base de incrementar polaridad, los extractos entonces siendo concentrados hasta la sequedad bajo presión reducida de alrededor de 150 libras por pulgadas cuadradas y a una temperatura de alrededor de 30°C.
- [0021] La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de la malaria comprendiendo un extracto de agua bioactiva de *Gomphostemma niveum* y uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables.
- 45 [0022] En una realización de la invención, los aditivos farmacéuticamente aceptables son seleccionados del grupo que consiste de diluyentes de vehiculos, agentes estabilizadores, agentes aromatizadores disolventes y otros similares.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS ACOMPAÑANTES****[0023]**

Fig. 1 es el perfil de la cromatografía líquida de alta resolución del extracto crudo de la invención.

Fig. 2 es el cromatograma de iones del extracto crudo después de fraccionamiento adicional.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

5 **[0024]** La creciente resistencia de *Plasmodium falciparum* a medicamentos disponibles actualmente tal como la cloroquina, presenta un desafío en el tratamiento de la malaria, la cual aun se mantiene como una de las principales causas de fallecimiento en el mundo. Por consiguiente son urgentemente necesitados nuevos agentes para tratar el organismo.

10 **[0025]** La presente invención proporciona una fracción de agua bioactiva llamado GN-W obtenida de las hojas de las plantas *Gomphostemma niveum* teniendo actividad inhibitoria contra el parásito malarial resistente a la cloroquina y sensible a la cloroquina. De acuerdo a otra realización del presente invento se proporciona el sencillo y eficaz método de extracción, aislamiento e identificación para el compuesto bioactivo procedente de hojas de *Gomphostemma niveum* secas al aire/sol .

15 **[0026]** Se describe también el desarrollo del método cromatográfico líquido de alta resolución de toma de huella (HPLC) para el control rutinario del extracto de crudo. Ésto proporciona una técnica adecuada para una bioevaluación in vitro e in vivo del extracto de crudo.

20 **[0027]** El efecto sinérgico ha sido también investigado en caso de bioensayo antimalarial in Vitro e in vivo del extracto crudo. También se describen los estudios de solubilidad y de estabilidad relacionada con la temperatura y la para la fracción bioactiva. Se describe también la evaluación de varias vías de administración su estabilidad en fluido del cuerpo, toxicidad, capacidad para alcanzar tejido infectado en una concentración adecuada durante el bioensayo in Vitro. De ahí que la presente invención proporciona una formula farmacéutica llamada GN-W la cual muestra excelente actividad antimalarial.

25 **[0028]** La descripción detallada de la invención proporciona una fracción de agua bioactiva llamada GN-W obtenida de la planta *Gomphostemma niveum* teniendo actividad inhibitoria contra el parásito malarial resistente a la cloroquina y sensible a la cloroquina.

**[0029]** El proceso de la fracción de agua bioactiva se muestra ahora con un ejemplo, el cual es ilustrativo de la presente invención.

El proceso comprendde los siguientes pasos:

**Paso 1**

30 **[0030]** En nuestros esfuerzos/intentos de aislar e identificar compuestos de origen natural más potentes que sean activos contra el parásito malarial resistente a la cloroquina, llevamos a cabo un fraccionamiento sistemático bioguiado del extracto acuoso preparado a partir de las hojas de la planta medicinal india *Gomphostemma niveum*. El material de la planta (hojas) se recolecta en el mes de Junio y Septiembre de Dhemaji Assam situado en la parte Noreste de India con la ayuda del Laboratorio de Investigación de Defensas, Texpur. Las hojas son secadas a la sombra durante 35 48 horas y molidas en polvo fino.

**Paso 2**

40 **[0031]** Extraer los 100 gr de hojas secas con 500 ml de agua triplemente destilada usando el método de extracción de soxhlet a temperatura de reflujo (100°C) durante 8 horas, Tres extracciones repetidas son llevadas a cabo usando 500 ml de agua triplemente destilada respectivamente. Los extractos son entonces filtrados, combinados juntos y concentrados hasta sequedad bajo presión reducida (a 86 libras por pulgada y 46°C) usando el evaporador giratorio. La fracción concentrada se llama GN-W (25gr).

**Paso 3**

45 **[0032]** El extracto acuoso GN-W (25gm) es además fraccionado por extracción líquido-líquido usando diferentes disolventes como hexano (200 ml), éter dietílico (200ml), cloroformo (200ml) y etanol (200ml) sobre la base de su polaridad creciente. Todos los extractos son combinados juntos de manera separada y concentrados hasta secado bajo presión reducida(150 psi y 30°C) y llamados GN-E (10gr), GN-C (2gr) y GN-ET (6gr). Todas estas fracciones son probadas respecto a estudios de inhibición del parásito antimalarial. El resultado indica que la fracción de éter/cloroformo muestra la bioactividad máxima contra el parásito malarial. El porcentaje de inhibición para la fracción éter/cloroformo es 86-90%. Una rasgo interesante puede ser observado que la fracción etanólica no inhibe el 50 crecimiento del parásito malarial. Por consiguiente planteamos una hipótesis de que el extracto de éter podría contener

algunos principios activos que son capaces de inhibir el crecimiento del parásito malarial. Por lo tanto para aislar el principio biológicamente activo se hace una cromatografía de columna del para la fracción de éter/cloroformo (GN-E). La lista de extractos preparados y el tratamiento de laboratorio se muestran en la tabla 1.

TABLA-1.

Nombre de Planta y parte	Disolvente	Código
Hojas de Gomphostemma niveum	Agua	GN-W
	Hexano	GN-H
	Éter dietílico	GN-E
	Cloroformo	GN-C
	Etanol	GN-ET

5

**Paso 4**

[0033] Para purificar el principio activo del extracto de éter/cloroformo se realiza la cromatografía de columna de gel de sílice. Cualquier persona que esta cualificada en la materia de los asuntos relacionados puede realizar la técnica. Alrededor de 10 gr de fracción de éter es empaquetado en un gel de sílice (100gr, malla 200-400) fracciones de columna son posteriormente analizadas para su actividad inhibitoria in Vitro contra el *P. falciparum*. El resultado indica que los eluados de fracciones de columna usando 50-60% de hexano en acetato etílico son capaces de inhibir el parásito malarial y por consiguiente procesar la capacidad para curar la malaria. La cantidad de disolventes usada para la elución de diferentes componentes de la fracción de éter son como sigue:- Hexano 100-500 ml (1-8 fracciones), 10-20% de acetato etílico en 25-50 ml de hexano (1-2 lit), 40-50% de acetato etílico en 25-50 ml de hexano (1-2 lit) 50-60% de acetato etílico en 25-50ml de hexano (1.5-2.5 lit).

10

15

**Paso 5**

[0034] La extracción paralela también es llevada a cabo tomando 50-60 gr de hojas usando hexano (100- 200 ml), éter dietílico/cloroformo (100-200ml), cloroformo (100-200 ml) y alcohol etílico (100-200 ml) a temperatura de reflujo y también a temperatura ambiente durante 8-10 horas. Los extractos son entonces filtrados, combinados y concentrados a sequedad bajo presión reducida (a 150-200 libras por pulgada and 30°C) usando el evaporador giratorio. Fracciones concentradas son comparadas con respecto a su perfil HPLC y también evaluadas in Vitro.

20

**Paso 6**

[0035] La separación de los componentes en los extractos fue llevada a cabo en el instrumento Waters HPLC con detector ultravioleta. Un método de tomador de huellas fue también desarrollado para la observación rutinaria del extracto crudo. Las condiciones HPLC son como sigue:

25

Columna: NOVAPAK C-18,

Bomba: LC-600 de agua

150X3.9MM, F MICRON

Detector ultravioleta. 486 de agua

Fase Móvil:

Sistema Isocrático de fase invertida

Acetonitrilo: Agua (60:40)

Índice de flujo: 1MI/Min

Detector  $\lambda$ :254 NM**Paso 7****Análisis de cromatografía líquida y espectrometría de masas de fracción éter bioactiva (GN-E).**

[0036] Una alícuota de la muestra es pesada con exactitud para disolución a una concentración analítica final de 100 $\mu$ g/ml. En algunos casos sin embargo el contenido entero de cantidad sin especificar tiene que ser reconstituido en 1 ml de disolvente apropiado como se especifica en los detalles de presentación de muestra y diluido 100:1 para el análisis.

30

**CONDICIONES DE LC (concentración de líquido) (Isocrático)**

**[0037]**

Columna: Waters Symmetry de aguas C18 2.1x 100mm

Fase Móvil: A = Agua B = Acetonitrilo

Gradiente: Isocratico 60/40 A:B

5 Velocidad de flujo: 400µl min separado 4:1 en origen

Volumen de inyección: 20µl

Detector Ultravioleta: Diode Array 220-300nm (254nm extraído)

**CONDICIONES LC (Gradiente)**

**[0038]**

10 Columna: Waters Symmetry C18 2.1x 100mm

Fase Móvil: A= Agua+0.1% Ácido fórmico

B= Acetonitrilo+0.1% Ácido fórmico

Gradiente: 5% a 95%B en 15minutos, mantener a 20mins entonces reequilibrar a 5%B a 30minutos

Velocidad de flujo: 400µl min separación 4:1 desde origen Volumen de Inyección: 20µl

15 Detector Ultravioleta: **Diode Array** 220-300nm (254nm extraído)

**CONDICIONES DE ESPECTROMATRÍA DE MASAS**

**[0039]**

Modalidad de Ion: Electrospray +ve

20 Adquisición: 80-800Da en Ispectrum/seg, empujador manual a 35µsec modalidad en tiempo real de masa exacta centroide.

**Lockspray:** Masa de referencia (Sulfadimetoxina 311.0814Da)

Resolución: Cono de muestreo de 6, OOOAAM : 40V

Gas de colisión: Argón

Energía de colisión: Estudio de EM = 5eV electronvoltio (sin fragmentación)

**25 CONDICIONES DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

**[0040]**

Modalidad de Ion: Electrospray +ve

Adquisición: 80-800Da a Ispectrum/seg, empujador manual a 35µsec (presión por segundo modalidad en tiempo real de masa exacta centroide).

30 Lockspray: Masa de referencia (Sulfadimetoxina 311.0814Da)

Resolución: Cono de muestreo de 6, OOOAAM: 40V Gas de colisión:

Energía de colisión: 10eV a 40eV (optimizado para componentes individuales)

**Paso 8**

**Evaluación in Vitro de la actividad antimalarial**

35 **[0041]** Dos cepas de cepa sensible a la cloroquina y una cepa de *P. falciparum* aisladas de los pacientes de la region del pais de Jadalpur es adaptada y mantenida in Vitro. Los cultivos son mantenidos conforme a los procedimientos de cultivo standard descritos anteriormente. Los parásitos son cultivados en O +ve RBCs humano con la adición de medios de cultivo RPMI 1640 con 10% de serum de Himan como suplemento. Las células son incubadas a 37°C en

- 5 atmosfera de CO<sub>2</sub> 5% y la parasitemia son comprobados después de 24 horas y los medios cambiados. Cuando la parasitemia excedía un 10% de las células parasitizadas las cultivadas con la adición de células sanguíneas rojas frescas. El crecimiento del parásito sincroniza por el método de lisis de sorbitol y parásitos de etapa de anillo sincronizado son usado para ensayo. La prueba in Vitro es hecha en 100µl de medios completos por pocillo con la adición de 10µl de eritrocitos con un 2% de etapas de anillo de parásitos. Todas las pruebas son hechas en duplicados con placas de cultivo de tejido en 96 pocillos de fondo plano y disoluciones dobles son hechas para cada uno de los compuestos de prueba con pocillos de control individual unicamente con el suplemento de RPMI 1640 y suero humano. El crecimiento de los parásitos en la presencia de cada uno de los compuestos de prueba, la cloroquina y los pocillos de control son observados por frotis de sangre teñida Giemsa hecho después de 24 horas de incubación. El recuento está hecho para la presencia de schizonts maduros entre 200 parásitos asexuales y el promedio de inhibición de maduración del schizont es calculada por medio de la fórmula  $(1-Nt/Nc) \times 100$  donde en Nt (neutrofina) and Nc (nitrocelulosa) representa el número de schizont presente en la prueba y control respectivamente. Los valores de IC 50, IC 90 and IC 99 son calculados usando el paquete de estadística comercial Sigmastat.
- 10

#### Estudios de inhibición antimalarial in vitro

- 15 [0042]

Compuesto	IC <sub>50</sub>	IC <sub>90</sub>
GN-W	153.23 µg/ml	752.29 µg/ml
GN-E	103.53 µg/ml	388.24 µg/ml
Cloroquina	0.025 µM	0.046 µM

**REIVINDICACIONES**

1. Una fracción de agua bioactiva obtenible de las hojas de *Gomphostemma niveum*.
2. Un método para la preparación de una fracción bioactiva novedosa de *Gomphostemma niveum* comprendiendo secar al aire hojas de la planta, pulverizando las hojas secadas al aire y sometiendo el polvo a extracción con agua filtrando el extracto y concentrandolo a sequedad bajo fracción reducida para obtener el extracto de agua bioactiva.
- 5 3. Un método como se reivindica en Reivindicación 2 en donde la extracción de agua es llevada a cabo 3 veces.
4. Un método como se reivindica en Reivindicación 2 o 3 en donde cada extracción es llevada a cabo por el método de extracción Soxhlet a una temperatura de reflujo durante 8 horas.
5. Un método como se reivindica en Reivindicación 2 a 3 en donde cada extracción es llevada a cabo usando agua triplemente destilada.
- 10 6. Un método como se reivindica en Reivindicación 2 a 5 en donde el extracto filtrado es concentrado a sequedad bajo presión reducida de alrededor de 86 libras por pulgada cuadrada a una temperatura de alrededor de 46°C usando un evaporador giratorio.
- 15 7. Un método como se reivindica en Reivindicación 6 en donde el extracto acuoso es además fraccionado por extracción líquido-líquido usando disolventes seleccionados del grupo que consta de hexano, éter dietílico, cloroformo y etanol sobre la base de incrementar polaridad, los extractos entonces siendo concentrados a sequedad bajo presión reducida de 150 libras por pulgada cuadrada y a una temperatura de alrededor de 30°C.
8. Una composición farmacéutica para el tratamiento de la malaria comprendiendo un extracto de agua bioactiva de *Gomphostemma niveum* y uno o más aditivos admisibles farmacéuticamente.
- 20 9. Una composición como se reivindica en Reivindicación 8 en donde los aditivos farmacéuticamente admisibles son seleccionados del grupo que consta de vehículos, diluyentes, agentes estabilizadores, disolventes, agentes aromatizantes, ligantes, lubricantes y otros similares.
10. Una composición farmacéutica como se reivindica en Reivindicación 8 y 9 en donde la composición es compuesta con miel dispersando los constituyentes en miel.
- 25 11. Uso de una composición farmacéutica como se define en Reivindicación 8 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la malaria.



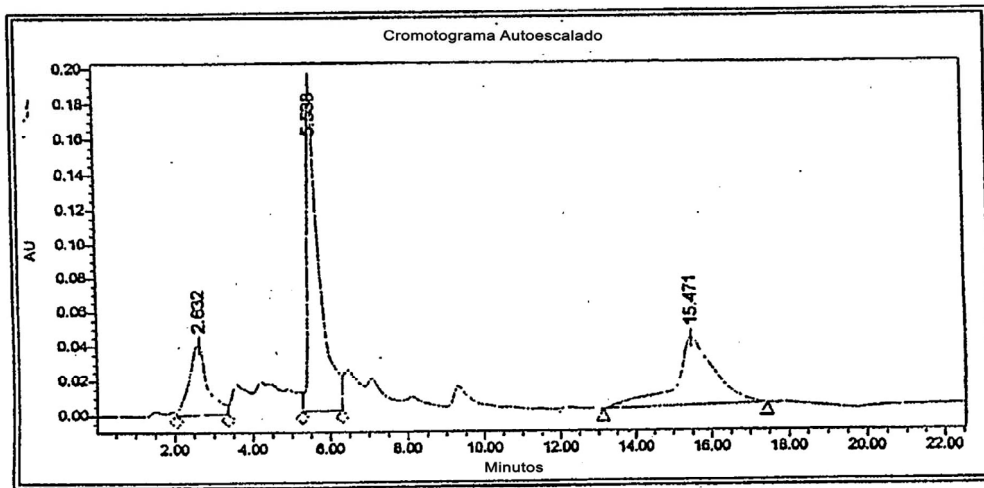


Figura-1 Perfil HPLC del extracto crudo

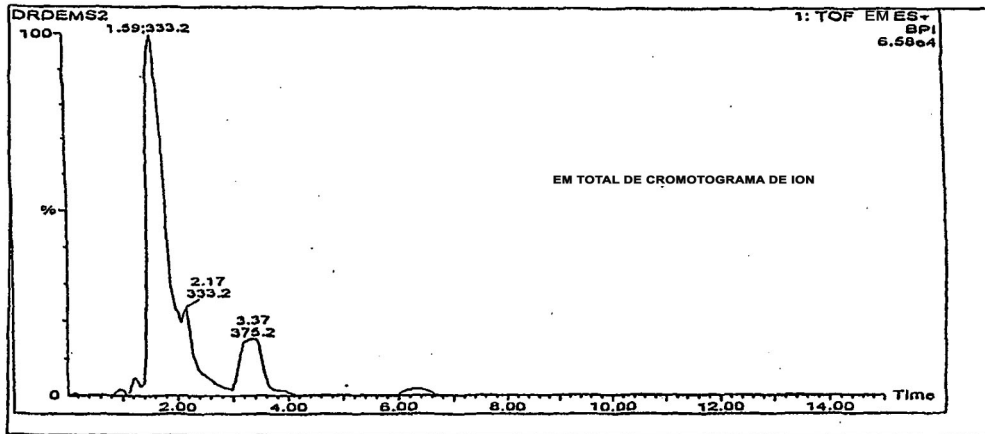


Figura-2 Total cromograma de ion de GN-E

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

Esta lista de referencias citada por el solicitante es para la conveniencia/interés del lector unicamente. No forma parte del documento de la Patente Europea. Incluso aunque se ha tomado gran cuidado al recopilar las referencias, los errores omisiones no pueden ser excluidos y las disclaims de la EPO son liable al respecto.

- 5 **Documentos de Patentes citados en la descripción**
- GB 106430 A [0002]
  - US 6710074 B [0002] [0003]
  - US 6737438 B [0003]
  - WO 2004000306 A [0003]
- 10
- US 6627641 B [0003]
  - US 6531487 B [0003]
  - US 6486199 B [0003]
  - US 6143756 A [0003]
  - WO 9948501 A [0003]
- 15
- DE 3220426 [0003]
  - WO 2004000319 A [0003]
  - US 5264726 A [0003]
  - US 2003212098 A [0003]
  - EP 1076057 A [0003]
- 20
- US 5290553 A [0003]
- Literatura no de Patentes citada en la descripción**
- **Greenwood.** Nature, 2002, vol. 9415, 670 [0002]
  - **Depote et al.** Trends in parasitology, 2004, vol. 4 (20), 165-198 [0002]
- 25
- **Sachs et al.** Nature, 2002, vol. 686 (415 [0002]
  - **Ringwald et al.** Bulletin of the world health organization, 1999, vol. 77 (1), 34 [0002]
  - **White et al.** Delaying anti-malarial drug resistance with combination chemotherapy. Parásitología, 1999, 301-308 [0002]
- 30
- **Tulp.** Drug discovery today, 2004, 450 [0002]
  - **Klayman.** Science, 1985, 1049 [0002]
  - **Bharel et al.** Fitoterapia, 1996, 387-399 [0002]
  - **Haynes et al.** Curr. Opin. Infect. Dis, 2001, 719-726 [0002]
- 35
- **Schmid et al.** J. Am. Chem. Soc., 1983, 624-625 [0002]
  - **Haynes et al.** Curr. Opin. Infect. Dis., 2001, 719-726 [0002]
- 40
- **Wiesner et al.** Angew. Chem. Int. Ed., 2003, 5274-5293 [0003]