

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 190**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/557** (2006.01)  
**A61K 31/12** (2006.01)  
**A61K 36/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05723895 .8**  
96 Fecha de presentación: **26.02.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1718313**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.11.2006**

54 Título: **Composición farmacéutica antiinflamatoria sinérgica para reducir la inflamación mediada por PGE2**

30 Prioridad:  
**27.02.2004 US 789814**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.05.2012**

73 Titular/es:  
**METAPROTEOMICS, LLC**  
**100 AVENIDA LA PATA**  
**SAN CLEMENTE, CA 92673, US**

72 Inventor/es:  
**BABISH, John, G.;**  
**TRIPP, Matthew, L. y**  
**BLAND, Jeffrey, S.**

74 Agente/Representante:  
**Aznárez Urbieto, Pablo**

ES 2 381 190 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica antiinflamatoria sinérgica para reducir la inflamación mediada por PGE2

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen RIAA e IAA derivadas de lúpulo (*Humulus lupulus*) y a su uso para reducir la inflamación.

5 Las prostaglandinas (PG) son hormonas ubicuas que actúan como mediadores tanto paracrinos como autocrinos, influyendo en múltiples cambios fisiológicos del entorno celular inmediato. Los diversos efectos fisiológicos de las PG incluyen reacciones inflamatorias tales como artritis reumatoide y osteoartritis, control de la tensión arterial, agregación plaquetaria, inducción del parto y agravamiento del dolor y la fiebre. Hace 30 años se descubrió que la aspirina y otros analgésicos no esteroideos inhibían la producción de PG, por lo que la síntesis de PG se identificó  
10 como una diana para el desarrollo de fármacos. Existen al menos 16 PG distintas en nueve clases químicas diferentes, denominadas PGA a PGI. Las PG forman parte de una familia mayor de compuestos que contienen 20 carbonos denominados eicosanoides; éstos incluyen prostaciclina, tromboxano y leucotrienos. La matriz de las PG producidas varía en función de la maquinaria enzimática aguas abajo presente en un tipo celular particular. Por ejemplo, las células endoteliales producen principalmente PGI<sub>2</sub>, mientras que las plaquetas producen principalmente  
15 TXA<sub>2</sub>.

El ácido araquidónico sirve como sustrato principal para la biosíntesis de todas las PG. La ciclooxigenasa (prostaglandina-endoperoxido-sintasa, EC 1.14.99.1, COX) cataliza el paso limitante del metabolismo del ácido araquidónico en prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), que se metaboliza adicionalmente en diversas prostaglandinas, prostaciclina y tromboxano A<sub>2</sub> (véase la Figura 1). A principios de la década de los 90 se comprobó que la COX existe en dos isoformas, denominadas habitualmente COX-1 y COX-2. Posteriormente se determinó que las proteínas COX-1 y COX-2 se derivaban de distintos genes que divergieron mucho antes de pájaros y mamíferos. Las PG generadas vía las rutas de COX-1 y COX-2 son moléculas idénticas y, en consecuencia, tienen efectos biológicos idénticos. Sin embargo, la COX-1 y la COX-2 pueden generar un patrón único y cantidades variables de eicosanoides; por ello, diferencias relativas en la activación de estas isoenzimas pueden conducir a respuestas biológicas totalmente distintas. Las diferencias en la distribución en los tejidos y la regulación de la COX-1 y la COX-2 se consideran ahora cruciales para los efectos tanto beneficiosos como adversos de los inhibidores de la COX.

El concepto generalmente aceptado (dogma COX) es que la COX-1 se expresa de forma constitutiva en la mayoría de los tejidos, mientras que la COX-2 es la enzima inducible activada por estímulos proinflamatorios, incluyendo mitógenos, citoquinas y lipopolisacáridos (LPS) bacterianos en las células *in vitro* y puntos de inflamación *in vivo*. Principalmente en base a estas diferencias de expresión, la COX-1 se caracteriza como una enzima doméstica y se considera que participa en el mantenimiento de funciones fisiológicas tales como la citoprotección de la mucosa gástrica, la regulación del flujo sanguíneo renal y el control de la agregación plaquetaria. Se considera que la COX-2 principalmente media en la inflamación, aunque se ha encontrado una expresión constitutiva en el cerebro, los riñones y el tracto gastrointestinal.

Se cree que las prostaglandinas (PG) desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la mucosa gástrica humana. El dogma actual es que la COX-1 es responsable de la síntesis de PG en la mucosa gástrica normal para mantener la homeostasis de la mucosa y que la COX-2 es expresada por la mucosa gástrica normal en niveles bajos, induciéndose su expresión durante la curación de úlceras, después de exposición a endotaxano o de estimulación por citoquinas. Ahora parece que tanto la COX-1 como la COX-2 desempeñan funciones fisiológicas importantes en la mucosa gástrica normal.

Compuestos que inhiben la producción de PG por la COX se han convertido en fármacos importantes para el control del dolor y la inflamación. Estos agentes son conocidos colectivamente como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) y sus indicaciones principales son la osteoartritis y la artritis reumatoide. Sin embargo, el uso de NSAID, y en particular de aspirina, se ha extendido a la profilaxis de enfermedades cardiovasculares. Durante la última década se han dedicado esfuerzos considerables al desarrollo de nuevas moléculas inhibitoras directas de la actividad enzimática de la COX-2, al deducirse que estos compuestos serían menos irritantes para el estómago con el uso crónico.

El documento US 5.073.396 describe una cerveza aromatizada con una fracción de esencia de lúpulo no ácida. El documento XP 002429538 (Disensation- Kaltner, D., 30.11.2000) da a conocer una concentración variable de ácidos alfa y beta en lúpulo. La US 2004/0137096 describe una composición farmacéutica antiinflamatoria que inhibe la enzima COX-2. La US 5.604.263 da a conocer una composición farmacéutica para tratar la osteoporosis que comprende, como principio activo, una cantidad eficaz de uno o más compuestos seleccionados de entre el grupo consistente en humulona, cohumulona, adhumulona, isohumulona, isocohumulona e isoadhumulona, en combinación con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La US 2002/0086070 da a conocer composiciones terapéuticas que tienen propiedades antiinflamatorias y de reparación de las articulaciones. La US 2003/0113393 describe una formulación que sirve para inhibir específicamente la respuesta inflamatoria mediada por COX-2 en animales. La US 2003/0096027 da a conocer una formulación que sirve para inhibir la respuesta inflamatoria en animales. La US 6.391.346 describe una composición herbal capaz de reducir la inflamación en

5 huesos y articulaciones en animales, preferentemente en humanos, mientras promueven un sueño seguro y tranquilo. La US 2004/0219240 da a conocer extractos de lúpulo o derivados de los mismos para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un paciente en relación con trastornos de tipo ulcerativo del estómago y/o el intestino. Smith, R.J. y col., J. Am. Soc. Brew. Chem 56 (2): 52-57, 1998, "Natural Foam Stabilizing and Bittering Compounds Derived from Hops", da a conocer diversas resinas de lúpulo naturales que han sido aisladas mediante HPLC preparativa a partir de lúpulo y productos de lúpulo. Vanhoenacker, G. y col., J. Chromatography A 1035 (2004) 53-61, "Analysis of iso- $\alpha$ -acids in beer by direct injection and liquid chromatograph with ultraviolet absorbance detection or with mass spectroscope", dan a conocer un método de cromatografía en líquido para el análisis simultáneo de ácidos iso- $\alpha$  y ácidos iso- $\alpha$  reducidos en cerveza.

10 El principal problema asociado a la determinación de la selectividad de la COX-2 (es decir, bajo potencial de irritación gástrica) consiste en que las diferencias en la metodología de ensayo pueden influir notablemente en los resultados obtenidos. La Tabla 1 muestra las categorías de los numerosos ensayos *in vitro* desarrollados para analizar y comparar las actividades inhibitorias relativas de los NSAID y de compuestos naturales contra la COX-1 y la COX-2. Estos sistemas de análisis se pueden clasificar en tres grupos: (1) sistemas donde se emplean enzimas animales, células o líneas celulares animales; (2) ensayos donde se utilizan líneas celulares humanas o plaquetas y monocitos humanos; y (3) modelos actualmente en desarrollo donde se utilizan células humanas representativas de las células diana para los efectos antiinflamatorios y adversos de los NSAID y complementos alimenticios. En general, aquellos modelos donde se utilizan líneas celulares humanas o plaquetas y monocitos humanos son la norma actual y no se han presentado modelos de células diana validados. Existe una necesidad crítica de una línea celular gástrica humana capaz de evaluar el potencial de irritación gástrica.

15 Las enzimas utilizadas pueden ser de origen animal o humano, pueden ser nativas o recombinantes y se pueden utilizar como enzimas purificadas, en preparaciones microsómicas o en ensayos de células completas. Otras variables del sistema incluyen la fuente de ácido araquidónico. La síntesis de PG se puede medir a partir del ácido araquidónico liberado de forma endógena o del ácido araquidónico añadido de forma exógena. En este último caso, en laboratorios distintos se utilizan concentraciones diferentes.

20 Un ensayo ideal para la selectividad de la COX-2 tendría las siguientes características: (1) se deberían utilizar células completas conteniendo enzimas humanas nativas bajo control fisiológico normal en relación con la expresión; (2) las células también deberían ser células diana para los efectos antiinflamatorios y adversos de los compuestos; (3) la COX-2 debería inducirse, simulando así un proceso inflamatorio, más que expresarse de forma constitutiva; y (4) la síntesis de PG se debería medir a partir del ácido araquidónico liberado de las reservas endógenas más que a partir del ácido araquidónico añadido de forma exógena.

Tabla 1 Clasificación de los sistemas de análisis para ensayos *in vitro* evaluando la selectividad de la COX-2 de compuestos antiinflamatorios †

SISTEMAS DE ANÁLISIS		
ANIMAL	HUMANO	DIANA
Enzimas	Enzimas	Células de mucosa gástrica humana
Células	Células	Condrocitos humanos
Líneas celulares	Líneas celulares	Sinoviocitos humanos
D. OTRAS VARIABLES DEL SISTEMA		
1. Fuente de ácido araquidónico - endógena o exógena.		
2. Diversos sistemas de expresión de replicación génica de COX-1 y COX-2.		
3. Presencia o ausencia de un agente inductor de COX-2.		
4. Los agentes inductores de COX-2 se administran en concentraciones diferentes y durante períodos de tiempo diferentes.		
5. Duración de incubación con el fármaco o con ácido araquidónico.		
6. Variación de la concentración de proteína en el medio.		
† Adaptada de Pairet, M. y van Ryn, J. (1998) Experimental models used to investigate the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 by non-steroidal anti-inflammatory drugs. <i>Inflamm. Res</i> 47, Suplemento 2S93-S101.		

Ningún laboratorio ha desarrollado todavía un análisis ideal para la selectividad de la COX-2. El sistema de células completas utilizado más habitualmente para los fármacos sujetos a prescripción médica (Rx) y medicamentos no sujetos a prescripción médica (*over the counter* - OTC) es el ensayo de sangre total humana desarrollado por el William Harvey Institute (Warner y col., Proc Natl Acad Sci USA 96: 7563-7568 (1999)). Hasta la fecha, este formato de ensayo ha desarrollado más datos que apoyan la relevancia clínica que ningún otro. Sin embargo, las nuevas investigaciones sobre el papel de la expresión constitutiva de la COX-2 en mucosa gástrica normal requieren una revisión de la relevancia del uso de plaquetas para la realización de modelos de inhibición de la COX-1 en ausencia de COX-2. La extrapolación de la gastrototoxicidad a partir de estudios con plaquetas ya no tiene una base molecular firme. La validación de una línea celular de mucosa gástrica humana para determinar la toxicidad potencial en el tejido diana de los inhibidores de la ciclooxigenasa representa una necesidad crítica para el desarrollo de agentes antiinflamatorios seguros y eficaces.

Una formulación ideal para el tratamiento de la inflamación inhibiría la inducción y actividad de la COX-2 sin inhibir la síntesis de PGE<sub>2</sub> en las células de la mucosa gástrica. Sin embargo, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos convencionales carecen de la especificidad necesaria para inhibir la COX-2 sin influir en la síntesis de PGE<sub>2</sub> gástrica y pueden provocar daños en el sistema gastrointestinal cuando se utilizan durante períodos prolongados. De hecho, incluso fármacos antiinflamatorios recientemente desarrollados como rofecoxib (Vioxx, Merck & Co., Inc.) y celecoxib (Celebrex, Pfizer, Inc.) provocan toxicidad gástrica perjudicial en forma de sangrado espontáneo inducido y retraso de la curación de úlceras gástricas.

#### Toxicidad de NSAID

Es sabido que los NSAID provocan graves problemas de salud, incluyendo hemorragia gástrica y daños renales. En Estados Unidos hay más de 13 millones de consumidores habituales de NSAID, cada año se hacen 70 millones de recetas de NSAID y se venden sin receta más de 30 millardos de pastillas de NSAID. Las enfermedades inducidas por NSAID provocan 103.000 hospitalizaciones y, de acuerdo con las estimaciones, 16.500 muertes al año. El veinte por ciento de todos los consumidores crónicos de NSAID desarrollarán una úlcera péptica. Los consumidores de NSAID corren un mayor riesgo (de tres a cuatro veces mayor) de sufrir hemorragia gastrointestinal superior, perforación o ambas cosas. El ochenta y uno por ciento de los pacientes hospitalizados con complicaciones graves inducidas por NSAID no tenían ningún síntoma gastrointestinal previo. Las personas de más de 60 años de edad tienen una probabilidad considerablemente mayor de sufrir complicaciones asociadas al uso de NSAID. Además, el 21% de todas las reacciones adversas a fármacos en Estados Unidos se debe al uso de NSAID.

Los nuevos inhibidores selectivos de la COX-2, como celecoxib y rofecoxib, han demostrado ser una alternativa más segura a la mayoría de los NSAID. Sin embargo, estudios recientes indican que los inhibidores selectivos de la COX-2 no eliminan por completo la toxicidad gastrointestinal. De hecho, en casos de inflamación o ulceración del tracto gastrointestinal, la prescripción de inhibidores de la COX-2 puede retrasar la curación de las úlceras.

Por consiguiente, sería útil identificar una formulación natural de compuestos que inhibieran específicamente o previnieran la síntesis de prostaglandinas por COX-2 con poco o ningún efecto en la síntesis de PGE<sub>2</sub> en la mucosa gástrica. Esta formulación sería útil para preservar la salud de los tejidos articulares y para tratar la artritis u otras afecciones inflamatorias. El concepto "inhibidor específico o selectivo de la COX-2" se emplea para incluir compuestos o mezclas de compuestos que inhiben selectivamente la COX-2 por encima de la COX-1. Sin embargo, aunque la consecuencia es que una selectividad calculada conducirá a un menor potencial de irritación gástrica, a no ser que los materiales de ensayo se evalúen en células gástricas el concepto "inhibidor selectivo de la COX-2" no implicará ninguna garantía de seguridad para las células gastrointestinales. Únicamente el análisis de la acción del compuesto en tejidos diana, células inflamatorias y células de la mucosa gástrica identificará los agentes con bajo potencial de irritación estomacal.

Por consiguiente, sería útil identificar una composición que inhibiera o previniera específicamente la expresión de la actividad enzimática de la COX-2 en células inflamatorias y tuviera poco o ningún efecto en la síntesis de PGE<sub>2</sub> en células de la mucosa gástrica, de modo que estas formulaciones pudieran ser utilizadas sin provocar trastorno gastrointestinal alguno. Además, estas formulaciones deberían permitir la curación de afecciones ulcerativas preexistentes en el estómago. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas correspondientes.

La invención proporciona una composición que comprende un ácido isoalfa reducido (RIAA) y un ácido isoalfa (IAA) derivados de lúpulo tal como se define en la reivindicación 1, estando el RIAA y el IAA en una relación de 3:1 a 1:10. La invención también proporciona una reducción de la inflamación mediante el uso de una composición que comprende un ácido isoalfa reducido (RIAA) y un ácido isoalfa (IAA) derivados de lúpulo, estando el RIAA y el IAA en una relación de 3:1 a 1:10, tal como se define en la reivindicación 13.

La Figura 1 muestra la inducción de ciclooxigenasa-2 y el metabolismo del ácido araquidónico en prostaglandinas y otros eicosanoides debidos a las enzimas ciclooxigenasa. Los agentes antiinflamatorios no esteroideos actúan a través de la inhibición directa de las enzimas de ciclooxigenasa.

La Figura 2 muestra una sinopsis de fracciones y compuestos que se pueden obtener del lúpulo.

La Figura 3 ilustra ejemplos de fracciones aisladas o derivadas del lúpulo. La figura 3A muestra el género de ácido alfa (AA) y las especies representativas humolona (R= -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), cohumulona (R=, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) y adhumolona (R= -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); la Figura 3B muestra el género de ácido isoalfa (IAA) y las especies representativas isohumulona (R= -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), isocohumulona (R=, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) e isoadhumolona (R= -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); la Figura 3C muestra el género de ácido isoalfa isomerizado reducido (RIAA) y las especies representativas dihidroisohumulona (R= -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), dihidroisocohumulona (R=, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) y dihidroisoadhumolona (R= -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); la Figura 3D muestra el género de ácido tetra-hidroisoalfa (THIAA) y las especies representativas tetrahidroisohumulona (R= -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), tetrahidro-isocohumulona (R=, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) y tetrahidroisoadhumolona (R= -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); la Figura 3E muestra el género de ácido hexahidroisoalfa (HHIAA) con las especies representativas hexahidroisohumulona (R= -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), hexahidroisocohumulona (R=, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) y hexahidroisoadhumolona (R= -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

La Figura 4 es una representación gráfica del parámetro Índice de Combinación calculado en función de la concentración de ácidos alfa isomerizados reducidos (RIAA), ácidos alfa isomerizados (IAA), con relaciones RIAA:IAA de 100:1 (Figura 4A), 10:1 (Figura 4B), 3:1 (Figura 4C), 3:2 (Figura 4D), 1:1 (Figura 4E), 2:3 (Figura 4F), 1:10 (Figura 4G), 1:100 (Figura 4H).

La presente invención proporciona composiciones y usos de las mismas para reducir la inflamación. En particular, la invención proporciona componentes derivados de lúpulo (*Humulus lupulus*) que inhiben de forma sinérgica la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Estas composiciones se pueden utilizar para reducir la inflamación. La invención proporciona extractos de lúpulo (*Humulus lupulus*) en forma de derivados del mismo para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la inflamación en un paciente. Por ejemplo, la invención proporciona una combinación de una o más fracciones derivadas de lúpulo que inhiben la inflamación de forma sinérgica. En una realización particular, la invención proporciona una reducción de la inflamación mediante el uso de una combinación de un ácido isoalfa y un ácido isoalfa reducido de lúpulo, los cuales inhiben de forma sinérgica la PGE<sub>2</sub>.

La toxicidad aguda de los derivados de lúpulo es muy baja. Por ello, si así se desea, se pueden utilizar dosis relativamente altas de derivados de lúpulo sin efectos tóxicos debidos al lúpulo. Las dosis tóxicas son considerablemente más altas que las dosis terapéuticas previstas de acuerdo con la presente invención.

Tal como se utiliza aquí, el concepto "complemento alimenticio" se refiere a composiciones de consumo que afectan cambios estructurales o funcionales de la fisiología. El concepto "composición terapéutica" se refiere a compuestos administrados para tratar o prevenir una enfermedad o para mejorar una señal o síntoma asociado a una enfermedad.

Tal como se utiliza aquí, el concepto "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad necesaria para lograr un resultado determinado. El experto medio en la materia puede determinar fácilmente dicha cantidad sin necesidad de experimentación no debida.

Tal como se utiliza aquí, el término "esencial" significa en gran medida pero no por completo aquello a que se refiere.

Tal como se utiliza aquí, el concepto "inhibidor de la COX" se refiere a una composición de compuestos capaz de inhibir la actividad o la expresión de las enzimas COX-2 o capaz de inhibir o reducir la gravedad, incluyendo el dolor y la hinchazón, de una respuesta inflamatoria seria.

Tal como se utiliza aquí, los términos "derivados" o "materia derivada" se refiere a una sustancia química que está relacionada estructuralmente con otra sustancia y que teóricamente se puede obtener a partir de ésta, es decir, una sustancia que se puede producir a partir de otra sustancia. Los derivados pueden incluir compuestos obtenidos por una reacción química. Los expertos en la técnica conocen los métodos para producir derivados de compuestos.

Tal como se utiliza aquí, el concepto "célula inflamatoria" se refiere a aquellos miembros celulares del sistema inmunológico, por ejemplo linfocitos B y T, neutrófilos o macrófagos, que participan en la síntesis de prostaglandinas en respuesta a señales inflamatorias tales como las interleucinas, factor de necrosis tumoral, bradiquinina, histamina o componentes derivados bacterianos.

Tal como se utiliza aquí, el concepto "células diana" se refiere a la población celular sobre la que se desea la inhibición de PGE<sub>2</sub> u otras síntesis de prostaglandina, por ejemplo células inflamatorias o células tumorales. Alternativamente, el concepto "células no diana" se refiere a la población celular sobre la que no se desea la inhibición de PGE<sub>2</sub> u otras síntesis de prostaglandina, por ejemplo células de la mucosa gástrica, nerviosas o renales.

Tal como se utiliza aquí, el concepto "extracto de lúpulo" se refiere al material sólido resultante de (1) exponer un producto vegetal de lúpulo a un disolvente, (2) separar el disolvente de los productos vegetales de lúpulo y (3) eliminar el disolvente.

Tal como se utiliza aquí, el término "disolvente" se refiere a un líquido de naturaleza acuosa u orgánica que presenta las características necesarias para extraer material sólido del producto vegetal de lúpulo. Ejemplos de disolventes

incluyen, de forma no exclusiva, agua, vapor, agua sobrecalentada, metanol, etanol, hexano, cloroformo, cloruro de metileno, CO<sub>2</sub> líquido o supercrítico, N<sub>2</sub> líquido o combinaciones de los mismos.

Tal como se utiliza aquí, el concepto “extracto de CO<sub>2</sub>” se refiere al material sólido resultante de exponer un producto vegetal de lúpulo a una preparación de CO<sub>2</sub> líquido o supercrítico y después eliminar el CO<sub>2</sub>.

5 Tal como se utiliza aquí, el concepto “orujo de lúpulo” se refiere al residuo sólido e hidrófilo de extracto de lúpulo.

Tal como se utiliza aquí, el concepto “ácido alfa” se refiere a compuestos conocidos colectivamente como humolonas que se pueden aislar de productos vegetales de lúpulo, incluyendo, entre otras, humolona, cohumolona, adhumolona, hulupona e isoprehumolona.

10 Tal como se utiliza aquí, el concepto “ácido isoalfa” se refiere a compuestos que han sido aislados de productos vegetales de lúpulo y que a continuación han sido isomerizados. La isomerización de ácidos alfa puede tener lugar térmicamente, por ejemplo por ebullición. Ejemplos de ácidos isoalfa incluyen, de forma no exclusiva, isohumolona, isocohumolona e isoadhumolona.

15 Tal como se utiliza aquí, el concepto “ácido isoalfa reducido” se refiere a ácidos alfa que han sido aislados de productos vegetales de lúpulo y que a continuación han sido isomerizados y reducidos, incluyendo formas cis y trans. Ejemplos de ácidos isoalfa reducidos (RIAA) incluyen, de forma no exclusiva, dihidroisohumolona, dihidroisocohumolona y dihidroisoadhumolona.

Tal como se utiliza aquí, el concepto “ácido tetrahidroisoalfa” se refiere a cierta clase de ácidos isoalfa reducidos. Los ejemplos de ácidos tetra-hidroisoalfa (THIAA) incluyen, de forma no exclusiva, tetrahidroisohumolona, tetrahidroisocohumolona y tetrahidroisoadhumolona.

20 Tal como se utiliza aquí, el concepto “ácido hexahidroisoalfa” se refiere a cierta clase de ácidos isoalfa reducidos. Ejemplos de ácidos hexahidroisoalfa (HHIAA) incluyen, de forma no exclusiva, hexahidroisohumolona, hexahidroisocohumolona y hexahidroisoadhumolona.

Tal como se utiliza aquí, el concepto “fracción de ácido beta” se refiere a compuestos conocidos colectivamente como lupulonas, incluyendo, entre otras, lupulona, colupulona, adlupulona y hexahidrocolupulona.

25 Tal como se utiliza aquí, el concepto “fracción de aceite esencial” se refiere a una mezcla compleja de componentes, incluyendo, entre otros, mirceno, humuleno, beta-cariofileno, undecano-2-ona y 2-metilbut-3-enol.

30 Tal como se utiliza aquí, el concepto “conjugados” de compuestos significa compuestos unidos de forma covalente o conjugados con un miembro seleccionado de entre el grupo consistente en mono- o disacáridos, aminoácidos, sulfatos, succinato, acetato y glutatión. El mono- o disacárido puede ser un miembro seleccionado de entre el grupo consistente en glucosa, manosa, ribosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, maltosa y fructosa.

35 La invención se refiere a la utilización de extractos de lúpulo para reducir la inflamación. La extracción de lúpulo en una u otra forma se remonta a hace 150 años, a principios del siglo XIX, cuando se intentó por primera vez la extracción en agua y etanol. Incluso en la actualidad, en Europa se encuentra un extracto con etanol, pero los extractos predominantes son con mucho extractos con disolventes orgánicos (por ejemplo hexano) y extractos con CO<sub>2</sub> (supercrítico y líquido). El CO<sub>2</sub> (típicamente a 60 bares de presión y a una temperatura de 50 a 10°C) está en estado líquido y es un disolvente relativamente suave, no polar, altamente específico para resinas blandas y aceites de lúpulo. Más allá del punto crítico, típicamente a 300 bares de presión y 60°C, el CO<sub>2</sub> presenta propiedades tanto de gas como de líquido y es un disolvente mucho más fuerte. En la Tabla 2 se compara la composición de los diversos extractos.

40 En el procedimiento más simple, la extracción de lúpulo incluye la molienda, granulación y nueva molienda del lúpulo para esparcir la lupulina, el paso de un disolvente a través de una columna de relleno para recoger los componentes de resina y, finalmente, la retirada del disolvente para obtener un extracto de resina total o “puro”.

Tabla 2 Extractos de lúpulo (porcentaje p/p)

Componente	Lúpulo	Disolv. orgánico	CO <sub>2</sub> supercrítico	CO <sub>2</sub> líquido
Resinas totales	12-20	15-60	75-90	70-95
Ácidos alfa	2-12	8-45	27-55	30-60
Ácidos beta	2-10	8-20	23-33	15-45
Aceites esenciales	0,5-1,5	0-5	1-5	2-10
Resinas duras	2-4	2-10	5-11	Nada

Componente	Lúpulo	Disolv. orgánico	CO <sub>2</sub> supercrítico	CO <sub>2</sub> líquido
Taninos	4-10	0,5-5	0,1-5	Nada
Ceras	1-5	1-20	4-13	0-10
Agua	8-12	1-15	1-7	1-5

Los principales extractantes orgánicos son disolventes fuertes, además de prácticamente todos los componentes de la lupulina. Extraen pigmentos vegetales, ceras cuticulares, agua y materiales solubles en agua.

5 El CO<sub>2</sub> supercrítico es más selectivo que los disolventes orgánicos y extrae menos taninos y ceras y menos agua y, en consecuencia, menos componentes solubles en agua. Extrae algunos de los pigmentos vegetales como clorofila, pero en bastante menor medida que los disolventes orgánicos. El CO<sub>2</sub> líquido es el disolvente más selectivo utilizado comercialmente para el lúpulo y produce la resina total y el extracto de aceite más puro. Apenas extrae las resinas duras o taninos, extrae niveles mucho más bajos de ceras vegetales, ningún pigmento vegetal y menos agua y materiales solubles en agua.

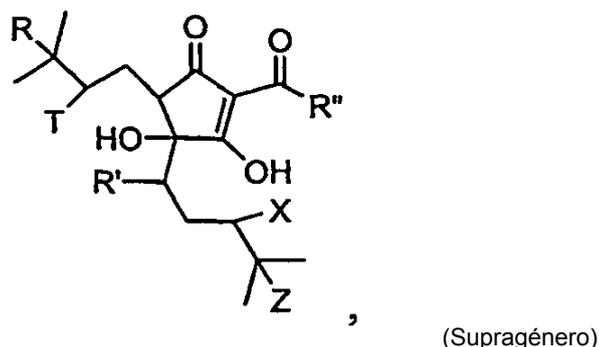
10 Debido a esta selectividad y a las propiedades disolventes más suaves, el rendimiento absoluto de la extracción con CO<sub>2</sub> líquido por peso unitario de lúpulo es menor que cuando se utilizan los otros disolventes arriba mencionados. Además, el rendimiento de ácidos alfa con CO<sub>2</sub> líquido (89-93%) es menor que con CO<sub>2</sub> supercrítico (91-94%) o con disolventes orgánicos (93-96%). Después de la extracción tiene lugar el proceso de eliminación del disolvente, que en el caso de los disolventes orgánicos implica el calentamiento para provocar la volatilización. A pesar de ello, en el extracto quedan trazas de disolvente. Sin embargo, la eliminación de CO<sub>2</sub> simplemente conlleva reducir la presión para volatilizar el CO<sub>2</sub>.

20 Como se muestra en la Figura 3, los extractos de lúpulo con CO<sub>2</sub> se pueden fraccionar en componentes, incluyendo aceites de lúpulo, ácidos beta y ácidos alfa. Los aceites de lúpulo incluyen, de forma no exclusiva, humuleno, beta-cariofileno, mirceno, farneseno, gamma-cadineno, alfa-selineno y alfa-cadineno. Los ácidos beta incluyen, de forma no exclusiva, lupulona, colupulona, adlupulona y hexahidrocolupulona, conocidas colectivamente como lupulonas. Los ácidos beta se pueden reducir para obtener ácidos tetra-beta. Los ácidos alfa incluyen, de forma no exclusiva, humulona, cohumulona, adhumulona, hupulona e isoprehumulona. Los ácidos alfa se pueden insomerizar para obtener ácidos isoalfa. Los ácidos isoalfa se pueden reducir para obtener ácidos isoalfa reducidos, ácidos tetrahidroisoalfa y ácidos hexahidroisoalfa.

25 Tobe y col. (Biosci. Biotech. Biochem 61(1):158-159 (1997)) informaron sobre la identificación de humulona de extracto de lúpulo como inhibidor de la resorción ósea. Estudios posteriores realizados por el mismo grupo caracterizaron el mecanismo de acción de la humulona como inhibidor de la transcripción del gen COX-2 después de estimulación de células MC3T3,E1 con TNFalfa (Yamamoto. FEBS Letter 465:103-106 (2000)). Se llegó a la conclusión de que la acción de la humulona (también humulón) era similar a la de los glucocorticoides, pero que la humulona no actuaba a través del receptor de glucocorticoides. Si bien estos resultados demuestran que la humulona inhibe la síntesis de PGE<sub>2</sub> en células MC3T3 (osteoblastos) a nivel génico, los expertos en la técnica no presupondrán que estos resultados se deben producir forzosamente también en células inflamatorias inmunes u otras líneas celulares. Tal como se dan a conocer aquí, los compuestos y derivados de lúpulo presentan un alto grado de selectividad tisular en células diana y no diana. Además, los derivados de lúpulo descritos en la presente invención son estructuralmente distintos del alfa ácido de humulona.

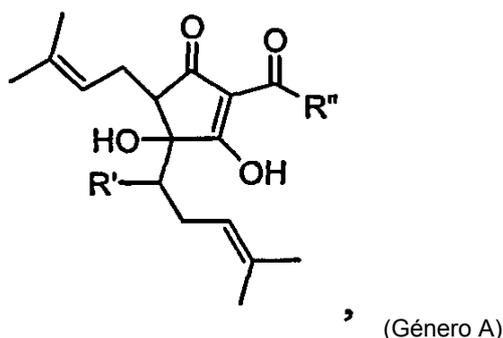
40 La invención proporciona composiciones que contienen al menos una fracción derivada de lúpulo (*Humulus lupulus*). Como ejemplos de fracciones aisladas o derivadas de lúpulo se mencionan: ácidos alfa, ácidos isoalfa, ácidos isoalfa reducidos, ácidos tetrahidroisoalfa, ácidos hexahidroisoalfa, ácidos beta y orujos de lúpulo. Las fracciones aisladas o derivadas de lúpulo incluyen, de forma no exclusiva, cohumulona, adhumulona, isohumulona, isocohumulona, isoadhumulona, dihidroisohumulona, dihidroisocohumulona, dihidroiso-adhumulona, tetrahidroisohumulona, tetrahidroisocohumulona, tetrahidroiso-adhumulona, hexahidroisohumulona, hexahidroisocohumulona y hexahidroiso-adhumulona. Los compuestos preferentes también pueden portar sustituyentes, como halógenos, éteres y ésteres.

45 Los compuestos de las fracciones aisladas o derivadas de lúpulo se pueden representar mediante el siguiente supragénero:



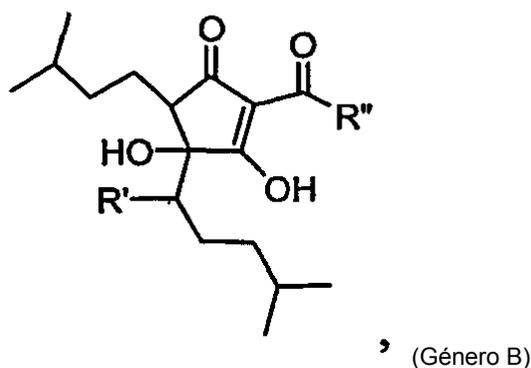
5 donde R' se selecciona de entre el grupo consistente en carbonilo, hidroxilo, OR y OCOR, siendo R alquilo; R'' se selecciona de entre el grupo consistente en CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; y R, T, X y Z se seleccionan, independientemente entre sí, de entre el grupo consistente en H, F, Cl, Br, I, y un orbital π, con la condición de que si uno de R, T, X y Z es un orbital π, el R, T, X o Z adyacente también es un orbital π, formando así un enlace doble.

En otra realización, los compuestos de las fracciones aisladas o derivadas de lúpulo se pueden representar mediante el siguiente género:



10 donde R' se selecciona entre el grupo consistente en carbonilo, hidroxilo, OR y OCOR, siendo R alquilo; y R'' se selecciona de entre el grupo consistente en CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. Ejemplos de estructuras del Género A incluyen ácidos isoalfa tales como isohumulona, isocohumulona, isoadhumulona y similares, y ácidos isoalfa reducidos tales como dihidroisohumulona, dihidroisocohumulona, dihidroisoadhumulona, y conjugados de éter o éster o modificaciones halogenadas del enlace doble.

En otra realización, los compuestos de las fracciones aisladas o derivadas de lúpulo se pueden representar mediante el siguiente género:



20 donde R' se selecciona de entre el grupo consistente en carbonilo, hidroxilo, OR y OCOR, siendo R alquilo; y R'' se selecciona de entre el grupo consistente en CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. Ejemplos de estructuras del Género B incluyen ácidos tetrahidroisoalfa tales como tetrahidroisohumulona, tetrahidroisocohumulona,

tetrahidroisoadhumulona y similares, y ácidos hexahidroisoalfa tales como hexahidroisohumulona, hexahidroisocohumulona y hexahidroisoadhumulona, y conjugados de éter o éster.

Como se muestra en la Figura 3, ejemplos de compuestos de un ingrediente aislado o derivado de lúpulo incluyen, de forma no exclusiva, humulona, cohumulona, adhumulona, isohumulona, isocohumulona, isoadhumulona, dihidroisohumulona, dihidroisocohumulona, dihidroisoadhumulona, tetrahidro-isohumulona, tetrahidroisocohumulona, tetrahidroisoadhumulona, hexahidro-isohumulona, hexahidroisocohumulona y hexahidroisoadhumulona. Los compuestos pueden portar sustituyentes, tal como muestran las fórmulas anteriores.

Los derivados de lúpulo son compuestos conocidos que se producen naturalmente en plantas y que se encuentran en productos alimenticios y bebidas. Se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos de extracción y procesamiento conocidos en la técnica. Los derivados de lúpulo se pueden preparar directamente a partir del material vegetal mediante cualquier modo conocido. Los derivados de lúpulo se pueden purificar mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante recristalización a partir de disolventes orgánicos acuosos, como alcoholes acuosos. También se pueden preparar modificaciones sintéticas de derivados de lúpulo de acuerdo con métodos conocidos en la técnica farmacéutica de la modificación de fármacos.

Además, de acuerdo con la presente invención se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad eficaz de derivados de lúpulo, opcionalmente en combinación con un diluyente o adyuvante farmacéutico.

#### Posología

Además, de acuerdo con la presente invención se proporcionan formulaciones farmacéuticas de formas galénicas orales que comprenden una cantidad eficaz de derivados de lúpulo para liberar el principio activo en un lugar deseado en el tracto gastrointestinal, por ejemplo en el estómago y/o el duodeno de acuerdo con técnicas de formulación conocidas, por ejemplo, pastillas de liberación lenta. De acuerdo con la presente invención también se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz tolerable de derivados de lúpulo. Debido a su baja toxicidad se pueden emplear altas dosis de derivados de lúpulo para obtener resultados útiles, dependiendo del efecto particular deseado.

Los derivados de lúpulo son particularmente adecuados para la administración oral. Por consiguiente, los derivados de lúpulo se pueden formular para uso oral, es decir: tabletas, tabletas revestidas, grageas, cápsulas, polvos, granulados y tabletas solubles, y formas líquidas, por ejemplo suspensiones, dispersiones o soluciones, opcionalmente junto con un principio activo adicional.

La invención también incluye un método para preparar las composiciones farmacéuticas aquí descritas, las composiciones preparadas mediante dicho método. Las composiciones se pueden producir mediante un método que incluye la mezcla de los derivados de lúpulo con un vehículo o material auxiliar farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente con una sustancia analgésica y/o antiinflamatoria y/o con otro(s) compuesto(s). Los expertos en la técnica conocen los métodos para preparar composiciones farmacéuticas (véase, por ejemplo, Genarro, ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, edición 18, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1990)).

El nivel de dosificación elegido dependerá de la actividad de la composición particular, de la vía de administración, de la gravedad de la afección a tratar o prevenir y del estado y el historial médico previo del paciente tratado. No obstante, una técnica habitual consiste en iniciar con dosis de la composición en niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado, aumentando gradualmente la dosis hasta lograr el efecto deseado. Si así se desea, la dosis diaria efectiva se puede dividir en múltiples dosis para su administración, por ejemplo de dos a cuatro dosis individuales al día. No obstante, se ha de entender que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de diversos factores, incluyendo el peso corporal, el estado de salud general, la dieta, el tiempo y la vía de administración, la combinación con otras composiciones y la gravedad de la afección particular a tratar o prevenir.

La invención proporciona una composición de acuerdo con las reivindicaciones para su uso, que incluyen el suministro de una cantidad eficaz de fracciones de lúpulo, compuestos de lúpulo o derivados de lúpulo, solos o en combinación con un principio activo adicional, tal como se da a conocer aquí. Por ejemplo, se puede formular una dosis diaria de composiciones de la invención para suministrar de 0,5 a 10.000 mg de una fracción de lúpulo, por ejemplo, de ácido alfa, ácido isoalfa, ácido isoalfa reducido, ácido tetrahidroisoalfa, ácido hexahidroisoalfa, ácido beta, orujo de lúpulo u otras fracciones de lúpulo, al día. Principalmente se puede formular una dosis diaria eficaz de la composición para suministrar de 50 a 7.500 mg de fracción de lúpulo, por ejemplo, de ácidos alfa, ácido isoalfa, ácido isoalfa reducido, ácido tetrahidroisoalfa, ácido hexahidroisoalfa, ácido beta, orujo de lúpulo u otras fracciones de lúpulo, al día. Por ejemplo, se puede formular una dosis diaria eficaz de la composición para suministrar de 100 mg a 5.000 mg, de 200 a 3.000 mg, de 300 a 2.000 mg, de 500 a 1.000 mg de fracción de lúpulo al día. En una realización, la dosis diaria eficaz se administra una o dos veces al día. Una realización proporciona una composición que comprende de 0,5 a 500 mg de ácido isoalfa o ácido isoalfa reducido, por ejemplo de 50 a 300 mg o de 100 a 200 mg de ácido isoalfa o ácido isoalfa reducido, al día. En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende de 10 a 3.000 mg de ácido isoalfa reducido, ácido tetrahidroisoalfa o ácido

hexahidroisoalfa al día, por ejemplo de 50 a 2.000 mg, de 100 a 1.000 mg, de 200 a 750 mg o de 250 a 500 mg de ácido isoalfa reducido, ácido tetrahidroisoalfa o ácido hexahidroisoalfa al día.

5 Una composición de las realizaciones para su aplicación tópica puede contener aproximadamente entre un 0,001 y un 10 por ciento en peso, por ejemplo entre un 0,01 y un 5 por ciento en peso o entre un 0,1 y un 1 por ciento en peso, de un derivado de lúpulo. Estas composiciones pueden producir concentraciones en suero en el intervalo entre 0,0001 y 10  $\mu\text{M}$ , por ejemplo entre aproximadamente 0,001 y 5  $\mu\text{M}$ , entre 0,01 y 1  $\mu\text{M}$  o entre 0,1 y 0,5  $\mu\text{M}$ , de una fracción aislada o derivada de lúpulo o de un conjugado de ésta.

10 En una composición de la invención en la que se combinan una o más fracciones tardías derivadas de lúpulo, las relaciones de dicha o dichas fracciones se pueden variar para optimizar el efecto deseado. Por ejemplo, tal como se da a conocer aquí, la sinergia de la inhibición de  $\text{PGE}_2$  mediante una combinación de RIAA e IAA se ha observado en células macrófagas RAW 264.7 (véase el Ejemplo 6). La sinergia entre RIAA e IAA se ha observado en combinaciones 3:1, 3:2, 1:1 y 1:10, respectivamente. Con las relaciones RIAA:IAA de 1:1 y 1:10 se ha observado una sinergia particularmente eficaz. La invención proporciona una composición que contiene una o más fracciones derivadas de lúpulo que inhibe la  $\text{PGE}_2$  de forma sinérgica. En una realización, la invención proporciona una combinación de RIAA e IAA en una cantidad y relación eficaz para inhibir la  $\text{PGE}_2$  de forma sinérgica. El RIAA y el IAA se combinan en una relación eficaz para inhibir la  $\text{PGE}_2$  de forma sinérgica, por ejemplo una relación RIAA:IAA de 3:1, 3:2 o 1:1 a 1:10, en particular 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 o 1:10.

#### Formulaciones

20 Las composiciones de la invención se pueden administrar en forma de complemento alimenticio o de composición terapéutica. Las composiciones se pueden administrar vía oral, tópica, transdérmica, transmucosal, parenteral y similar, en unidades de dosificación apropiadas, según se desee. Las composiciones para la administración dietética pueden incluir diversos aditivos tales como otros componentes naturales de metabolismo intermedio, vitaminas y minerales, y también ingredientes inertes tales como talco y estearato de magnesio, que son excipientes estándar en la producción de tabletas y cápsulas. Por ejemplo, una realización comprende principios activos de composiciones de la invención en combinación con glucosamina o sulfato de condroitina.

30 Tal como se utiliza aquí, el concepto "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, edulcorantes y similares, adecuados para ser administrados a un individuo. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de una amplia gama de materiales, incluyendo, de forma no exclusiva, diluyentes, aglutinantes y adhesivos, lubricantes, disgregantes, colorantes, materias no digeribles, saborizantes, edulcorantes y materiales diversos tales como tampones y absorbentes que pueden ser necesarios para preparar una composición terapéutica particular. El uso de estos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Se entiende que las formulaciones contienen componentes compatibles con los ingredientes activos. En una realización, la formulación incluye talco y estearato de magnesio. Otros ingredientes conocidos que pueden influir en la producción de una composición de la invención en forma de barrita alimenticia o alimento funcional pueden incluir saborizantes, azúcares, aminoazúcares, proteínas y/o féculas modificadas, así como grasas y aceites.

40 Los complementos alimenticios, lociones o composiciones terapéuticas de realizaciones de la invención se pueden formular mediante cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la materia. En una realización, la composición se formula en una cápsula o tableta utilizando técnicas disponibles para los expertos en la técnica. En forma de cápsula o tableta, la dosis diaria recomendada para un humano o animal adulto puede estar contenida en una a seis cápsulas o tabletas. Las composiciones también se pueden formular en otras formas convenientes, por ejemplo como solución o suspensión inyectable, solución o suspensión pulverizable, loción, chicle, pastilla, producto alimenticio o refrigerio. Los alimentos, refrigerios, chicles o pastillas pueden incluir cualquier ingrediente ingerible, incluyendo edulcorantes, saborizantes, aceites, féculas, proteínas, frutas o extractos de fruta, hortalizas o extractos de hortaliza, cereales, grasas o proteínas animales. Por consiguiente, las composiciones de la invención se pueden formular en forma de cereales, refrigerios tales como *chips*, barritas, pastillas de goma, caramelos masticables o pastillas de disolución lenta. Las composiciones de la invención se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades basadas en la inflamación, tanto agudas como crónicas. Algunas formulaciones particularmente útiles de composiciones de la invención pueden reducir la respuesta inflamatoria y así promover la curación del tejido afectado o evitar un mayor deterioro de éste. En las composiciones y formulaciones de la invención también se puede utilizar un vehículo farmacéuticamente aceptable.

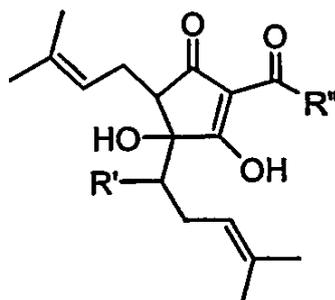
55 Las composiciones de la invención se pueden utilizar, por ejemplo, para el tratamiento de una inflamación en un sujeto y para el tratamiento de otros trastornos asociados a la inflamación, por ejemplo como analgésico para el tratamiento del dolor y jaquecas o como antipirético para el tratamiento de la fiebre. Las composiciones de la invención se pueden utilizar para tratar la artritis, incluyendo, de forma no exclusiva, artritis reumatoide, espondilopatías, artritis gotosa, osteoartritis, lupus eritematoso sistémico y artritis juvenil.

En una realización, la invención proporciona una composición que comprende un ácido isoalfa reducido (RIAA) y un ácido isoalfa (IAA) derivados de lúpulo, estando presentes el RIAA y el IAA en una relación de 3:1 a 1:10. En una composición de este tipo, el ácido isoalfa se puede seleccionar de entre isohumulona, isocohumulona e

isoadhumulona. El ácido isoalfa reducido se puede seleccionar de entre dihidroisohumulona, dihidroisocohumulona y dihidro-isoadhumulona.

5 La invención también proporciona una reducción de la inflamación mediante el uso de una composición que comprende un ácido isoalfa reducido (RIAA) y un ácido isoalfa (IAA) derivados de lúpulo, estando presentes el RIAA y el IAA en una relación de 3:1 a 1:10. El ácido isoalfa se puede seleccionar de entre isohumulona, isocohumulona e isoadhumulona. El ácido isoalfa reducido se puede seleccionar de entre dihidroisohumulona, dihidroisocohumulona y dihidro-isoadhumulona.

En una realización preferente, la invención proporciona una reducción de la inflamación mediante el uso de al menos dos compuestos del Genero A de fórmula:



10

(Género A)

donde R' se selecciona de entre el grupo consistente en carbonilo, hidroxilo, OR y OCOR, siendo R alquilo; y R'' se selecciona de entre el grupo consistente en CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; estando los dos compuestos en una relación de 10:1 a 1:10.

15 Además de ser útil para el tratamiento humano, algunas realizaciones de la invención también son útiles para el tratamiento de otros animales, incluyendo caballos, perros, gatos, aves, ovejas, cerdos y similares. Las formulaciones para el tratamiento de la inflamación pueden inhibir la inducción y la actividad de la COX-2 con poco efecto sobre la síntesis de PGE<sub>2</sub> en la mucosa gástrica. Históricamente, los NSAID utilizados para el tratamiento de la inflamación carecían de la especificidad de inhibir la COX-2 sin influir en la síntesis de PGE<sub>2</sub> en las células de la mucosa gástrica. Por ello, estos fármacos irritaban y deterioraban el sistema gastrointestinal cuando se utilizaban durante períodos de tiempo prolongados. Estas contraindicaciones no están asociadas a la presente invención y, por consiguiente, las formulaciones descritas se pueden utilizar durante períodos de tiempo prolongados provocando poca o ninguna gastropatía. La administración se puede llevar a cabo mediante cualquier método disponible para el experto, por ejemplo vía oral, tópica, transdérmica, transmucosal o parenteral.

25 La invención también proporciona una reducción de la inflamación mediante el uso de un ácido isoalfa y un ácido isoalfa reducido derivados de lúpulo (véase el Ejemplo 4). La combinación de ácido isoalfa y ácido isoalfa reducido inhibe la síntesis de PGE<sub>2</sub> de forma sinérgica en un modelo celular inflamatorio (Ejemplo 4).

30 Tal como se utiliza aquí, el concepto "reducción de la inflamación" se refiere a la disminución, mejoría o inhibición de una respuesta inflamatoria. Los expertos en la técnica pueden reconocer fácilmente una reducción de una señal o síntoma asociado a una respuesta inflamatoria. La reducción de la inflamación se puede referir a la disminución de la gravedad de una señal o síntoma asociado a la inflamación y también a una inhibición de la inflamación de modo que aparezcan muy pocos o ningún síntoma asociado a la misma.

35 Tal como se describe aquí, existen diversos ensayos para demostrar la eficacia de una o más fracciones aisladas o derivadas de lúpulo (véanse los ejemplos). Los expertos en la materia entenderán que una fracción aislada o derivada de lúpulo, tal como se describe aquí, se puede ensayar en cuanto a su actividad en la reducción de la inflamación utilizando diversos ensayos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo los ejemplos de ensayos incluidos en este documento.

**Ejemplo 1: Inhibición de la síntesis de PGE-2 en macrófagos de ratón estimulados y no estimulados con compuestos y derivados de lúpulo (*Humulus lupulus*)**

40 Resumen - Este ejemplo demuestra que ciertas fracciones y derivados de lúpulo inhiben la síntesis de PGE<sub>2</sub> por COX-2, preferentemente a través de la síntesis de PGE<sub>2</sub> por COX-1, en el modelo de macrófagos de ratón RAW 264.7.

Sustancias químicas y reactivos - El lipopolisacárido bacteriano (LPS; B *E. coli* 055:B5) se obtuvo en Sigma (St. Louis, MO). Las fracciones de lúpulo (1) Alpha hop (1% ácidos alfa; AA), (2) Aromahop OE (10% ácidos beta y 2%

ácidos alfa isomerizados), (3) Isohop (ácidos alfa isomerizados; IAA), (4) solución de ácido beta (ácidos beta BA), (5) Hexahop gold (ácidos alfa-hexahidro isomerizados; HHIAA), (6) Redihop (ácidos alfa isomerizados reducidos; RIAA), (7) Tetrahop (ácidos tetrahidro-iso-alfa THIAA) y (8) orujos de lúpulo, se obtuvieron de Betatech Hops Products (Washington, D.C., EEUU). Los orujos de lúpulo se extrajeron dos veces con volúmenes iguales de etanol absoluto. El etanol se eliminó por calentamiento a 40°C hasta que sólo quedó un residuo espeso de color marrón. El residuo se disolvió en DMSO para los análisis en células RAW 264.7. El producto Prostaglandin E2 EIA kit Monoclonal se adquirió en Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Los antisueros policlonales de conejo anti-COX-1 y anti-COX-2 se obtuvieron de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY); la IgG-HRP anticabra de burro se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). El suero bovino fetal inactivado por calor (FBS-HI N° Cat. 35-011CV) y el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM N° Cat. 10-013CV) se adquirieron de Mediatech (Herndon, VA). A no ser que se indique otra cosa, todos los reactivos estándar se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO) y eran los reactivos más puros comercialmente disponibles.

Los equipos utilizados en este ejemplo incluían: una balanza analítica OHAS Modelo N° E01140, un armario de bioseguridad Forma Modelo N° F1214 (Marietta, Ohio), diversas pipetas para suministrar de 0,1 a 100 µl (VWR, Rochester, NY), un contador de células manual (VWR N° Catálogo 23609-102, Rochester, NY), una incubadora de CO2 Forma Modelo N° F3210 (Marietta, Ohio), un hemacitómetro (Hausser Modelo N° 1492, Horsham, PA), un microscopio de inversión Leica Modelo N° DM IL (Wetzlar, Alemania), un Sistema de Pulido de Agua PURELAB Plus (U.S. Filter, Lowell, MA), un refrigerador a 4°C (Forma Modelo N° F3775, Marietta, Ohio), un agitador vórtex (VWR N° Catálogo 33994-306, Rochester, NY) y un baño de agua a 37°C (Shel Lab Modelo N° 1203, Cornelius, OR).

*Cultivo celular* - Células RAW 264.7, obtenidas de la American Type Culture Collection (N° Cat. TIB-71, Manassas, VA), se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Mediatech, Herndon, VA) y se mantuvieron en fase logarítmica. El medio de cultivo DMEM se preparó añadiendo 50 ml de FBS inactivado por calor y 5 ml de penicilina/estreptomina a una botella de 500 ml de DMEM y guardando la mezcla a 4°C. El medio de cultivo se calentó a 37°C en un baño de agua antes de su uso.

La mañana del primer día del experimento, las células RAW 264.7 en fase logarítmica se dispusieron en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos a razón de  $8 \times 10^4$  células por pocillo con 0,2 ml de medio de cultivo en cada pocillo. Al final del primer día (6 a 8 horas después de la disposición en la placa) se retiraron 100 µl de medio de cultivo de cada pocillo y se sustituyeron por 100 µl de medio fresco.

Se preparó una solución madre de 1 mg/ml de LPS, utilizada para inducir la expresión de COX-2 en las células RAW 264.7, disolviendo 1,0 mg de LPS en 1 ml de DMSO. Esta solución se agitó en el agitador vórtex y se guardó a 4°C. Antes de su uso, se fundió a temperatura ambiente o en baño de agua a 37°C.

El segundo día del experimento, los materiales de ensayo se prepararon a 1000X en DMSO. En tubos microfuga de 1,7 ml se introdujo 1 ml de DMEM sin FBS para las concentraciones de ensayo 0,01, 0,10, 0,5 y 1,0 µg/ml. Dos µl de la solución madre 1000X DMSO del material de ensayo se añadieron al mililitro de medio sin FBS. El tubo contenía la concentración final del material de ensayo concentrado en un factor 2 y se dispuso en una incubadora durante 10 minutos para equilibrarlo a 37°C.

Para la síntesis de PGE<sub>2</sub> asociada a COX-2, se retiraron 100 µl de medio de cada pocillo de las placas celulares preparadas el primer día y se sustituyeron por 100 µl a una concentración final 2X equilibrada de los compuestos de ensayo. Las células se incubaron durante 90 minutos. Se añadieron 20 µl de LPS a cada pocillo de células a estimular para alcanzar una concentración final de 10 ng LPS/ml y las células se incubaron durante 4 horas. Después de la estimulación con LPS, se observó el aspecto de las células y se evaluó su viabilidad mediante un ensayo colorimétrico basado en bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma, St. Louis, MO). La solución MTT se añadió directamente a los pocillos después de la toma de muestras para determinación de la PGE<sub>2</sub>. La absorbancia de cada pocillo se leyó a 580 nm utilizando un lector de placas ELISA. No se observó ninguna toxicidad a las concentraciones más altas ensayadas en ninguno de los compuestos. Veinticinco µl de medio sobrenadante de cada pocillo se transfirieron a un tubo microfuga limpio para determinar la PGE<sub>2</sub> liberada en el medio.

La PGE<sub>2</sub> se ensayó utilizando un procedimiento comercial no radiactivo para la cuantificación de PGE<sub>2</sub> (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), y se aplicó el procedimiento recomendado por el fabricante sin ninguna modificación. En pocas palabras, 25 µl del medio, junto con una dilución en serie de muestras estándar de PGE<sub>2</sub>, se mezclaron con cantidades apropiadas de un trazador marcado con acetilcolinesterasa y antisuero de PGE<sub>2</sub>, y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 18 h. Después de vaciar los pocillos y enjuagarlos con un tampón de lavado, se añadieron 200 µl de reactivo de Ellman que contenía sustrato para la acetilcolinesterasa. La reacción se llevó a cabo en un agitador lento a temperatura ambiente durante 1 hora y se determinó la absorbancia a 415 nm. La concentración de PGE<sub>2</sub> se representa en picogramos por 10<sup>5</sup> células.

Para la síntesis de PGE<sub>2</sub> asociada a COX-1, se retiraron 100 µl de medio de cada pocillo de las placas celulares preparadas el primer día y se sustituyeron por 100 µl a una concentración final 2X equilibrada de los compuestos de ensayo. Las células se incubaron durante 90 minutos. A continuación, en lugar de realizar la estimulación con LPS, las células se incubaron con ácido araquidónico 100 µM durante 15 minutos. Veinticinco µl de medio sobrenadante

de cada pocillo se transfirieron a un tubo microfuga limpio para determinar la PGE<sub>2</sub> liberada en el medio. Se observó el aspecto de las células y se determinó su viabilidad tal como se describe más arriba. No se observó ninguna toxicidad con las concentraciones más altas ensayadas en ninguno de los compuestos. Veinticinco µl de medio sobrenadante de cada pocillo se transfirieron a un tubo microfuga limpio para determinar la PGE<sub>2</sub> liberada en el medio. La PGE<sub>2</sub> se determinó y registró tal como se describe más arriba. Las concentraciones inhibitoras medianas (IC<sub>50</sub>) para la síntesis de PGE<sub>2</sub> tanto por COX-2 como por COX-1 se calcularon tal como se describe más abajo.

La concentración inhibitora mediana (IC<sub>50</sub>) para la síntesis de PGE se calculó utilizando CalcuSyn (BIOSOFT, Ferguson, MO). Este paquete estadístico realiza múltiples cálculos dosis-efecto de fármacos utilizando los métodos de efecto mediano descritos por Chou y Talaly, Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55. (1984).

En pocas palabras, el análisis correlaciona la "Dosis" y el "Efecto" del modo más simple posible:  $fa/fu = (C/C_m)^m$ , siendo C la concentración o dosis del compuesto y C<sub>m</sub> la dosis efectiva mediana referida a la potencia. El valor C<sub>m</sub> se determina a partir de la intersección con el eje X del gráfico mediana-efecto. La fracción influida por la concentración del material de ensayo es fa y la fracción no influida por la concentración es fu ( $fu = 1 - fa$ ). El exponente m es el parámetro que indica el carácter sigmoideo o la forma de la curva dosis-efecto. Se estima mediante la pendiente del gráfico mediana-efecto.

El gráfico mediana-efecto es un gráfico de  $x = \log(C)$  en función de  $y = \log(fa/fu)$  y se basa en la forma logarítmica de la ecuación mediana-efecto de Chou. La bondad del ajuste de los datos para la ecuación mediana-efecto está representada mediante el coeficiente de correlación lineal r del gráfico mediana-efecto. Normalmente, los datos experimentales de sistemas enzimáticos o receptores tienen un valor  $r > 0,96$ , los de cultivo de tejido un valor  $r > 0,90$  y los de sistemas animales un valor  $r > 0,85$ . En los estudios basados en células aquí descritos, todos los coeficientes de correlación lineal eran superiores a 0,90. Los experimentos se repitieron tres veces en tres fechas diferentes. Se calculó el promedio del porcentaje de inhibición de cada dosis de los tres experimentos independientes y se utilizó para calcular las concentraciones inhibitoras medianas que se dan a conocer aquí.

Tabla 3 Inhibición de la COX-2 y la COX-1 en células RAW 264.7 por fracciones y derivados de lúpulo

Material de ensayo	COX-2 IC <sub>50</sub> [µg/mg]	COX-1 IC <sub>50</sub> [µg/ml]	COX-1 IC <sub>50</sub> / COX-2 IC <sub>50</sub>
<b>Estructuras de Género A</b>			
Isohop (IAA)	0,13	18	144
Redihop (RIAA)	0,34	29	87
<b>Estructuras de Género B</b>			
Tetrahop (THIAA)	0,20	4,0	2
Hexahop (HHIAA)	0,29	3,0	11
<b>Ácidos alfa</b>			
Alpha hop (AA)	0,21	6,2	30
<b>Otros</b>			
Aromahop OE	1,6	4,1	2,6
Ácidos beta (BA)	0,54	29	54
Orujo de lúpulo (EtOH)	0,88	21	24

Como se muestra en la Tabla 3, todas las fracciones y derivados de lúpulo inhibieron la COX-2 por encima de la COX-1 en este modelo de macrófago diana. Esto fue un descubrimiento nuevo e imprevisto. La magnitud de la selectividad de COX-2 para los derivados de lúpulo IAA e IAA, superior en un factor de 144 y 87, respectivamente, fue inesperada. En este modelo de células RAW 264.7, los compuestos del Género A mostraron una mayor selectividad por COX-2 que los compuestos del Género B, con un promedio de inhibición de COX-2 116 veces superior y 16 veces superior, respectivamente. El ácido alfa, los ácidos beta y los orujos de lúpulo también eran inhibidores de la COX-2 altamente selectivos, con relaciones COX-1/COX-2 de 30, 54 y 24, respectivamente. No existe ningún informe previo de una selectividad de COX-2 tan alta en combinación con bajas concentraciones

inhibidoras medianas de productos naturales de otras fuentes. El Aromahop fue el menos selectivo de COX-2 con una relación COX-1/COX-2 de 2,6.

**Ejemplo 2: Ausencia de inhibición de la síntesis de PGE<sub>2</sub> en células de la mucosa gástrica por compuestos y derivados de lúpulo (*humulus lupulus*)**

5 Resumen - Este ejemplo ilustra la ausencia de inhibición de PGE<sub>2</sub> por fracciones de lúpulo y en la línea celular de la mucosa gástrica humana AGS, lo que implica un bajo potencial de irritación gástrica para estos compuestos.

Las sustancias químicas y reactivos se utilizaron tal como se describe en el Ejemplo 1. La PGE<sub>2</sub> se determinó y se registró tal como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1. Las concentraciones inhibidoras medianas (IC<sub>50</sub>) para la síntesis de PGE<sub>2</sub> de células AGS se calcularon tal como se ha descrito en el Ejemplo 1[2].

10 La línea celular de la mucosa gástrica humana AGS se obtuvo de la American Type Culture Collection (número ATCC CRL-1739; Manassas, VA) y se subcultivó de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las células se cultivaron de forma rutinaria a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en RPMI 1640 que contenía un 10% de FBS, con 50 unidades de penicilina/ml, 50 µg de estreptomycin/ml, 5% de piruvato de sodio y 5% de L-glutamina. Las células de crecimiento exponencial se sembraron en placas de 6 pocillos y se cultivaron hasta confluencia. Se tomó una muestra alícuota de 20 µl del medio sobrenadante para determinar el contenido de PGE<sub>2</sub>. Después, las células se lavaron en PBS, se rasparon y se sometieron a lisis para inmunotransferencia (*immunoblotting*).

15

Tabla 4 Concentraciones inhibidoras medianas (IC<sub>50</sub>) para síntesis de PGE<sub>2</sub> de derivados de lúpulo en el modelo de células AGS †

Compuesto	ACS IC <sub>50</sub> [µg/ml]	Interv confianza 95% [µg/ml]	r
<b>Ácidos alfa</b>			
Alphahop	17	2,4 - 124	0,927
<b>Estructuras del Género A ††</b>			
Ácidos iso-alfa			
Isohop (IAA)	16	4,9 - 54	0,970
Isorich	9,2	1,1 - 81	0,894
<b>Ácidos iso-alfa reducidos</b>			
Redihop (RIAA)	21	3,1 - 145	0,936
<b>Estructuras del Género B †††</b>			
Ácidos tetra-iso-alfa			
Tetrahop (TIDAL)	51	6,8 - 374	0,949
<b>Ácidos hexa-iso-alfa</b>			
Hexahop (HHIAA)	34	25 - 47	0,998
<b>Otros</b>			
BetaStab	73	18 - 291	0,977
Extracto de tanino n° 4411	59	11 - 324	0,963
Aromahop	43	21 - 85	0,992
N° 1115 (orujo de lúpulo)	35	8,5 - 141	0,970
<b>Control concurrente positivo</b>			
Aspirina	1,2	(0,37 - 4,1)	0,950
<b>Control histórico</b>			

Compuesto	ACS IC <sub>50</sub> [µg/ml]	Interv confianza 95% [µg/ml]	r
Aspirina	0,52	(0,26 - 1,0)	-
Ibuprofeno	0,57	(0,27 - 1,2)	-
Rofecoxib	1,8	(0,90 - 3,7)	-
Celcoxib	0,024	(0,0068 - 0,082)	-
† Los valores IC <sub>50</sub> se calculan a partir del promedio de tres ensayos independientes; las células AGS se dispusieron en placas y se permitió que alcanzaran una confluencia del 80%. Las células se lavaron y el material de ensayo se añadió 60 min antes del tratamiento con A23187. Treinta min después, el medio se retiró para determinar la PGE <sub>2</sub> .			

La Tabla 4 muestra las concentraciones inhibitoras medianas para la síntesis de PGE<sub>2</sub> de derivados de lúpulo en el modelo de células AGS. En general, las estructuras del Género B eran menos inhibitoras que las estructuras del Género A y los ácidos alfa. En el grupo del Género B, los valores IC<sub>50</sub> para THIAA y HHIAA eran de 51 y 34 µg/ml, respectivamente. Los valores IC<sub>50</sub> para IAA, Isorich e IAA del grupo del Género A eran de 16, 9,2 y 21 µg/ml, respectivamente, de promedio un 63% menores que los valores IC<sub>50</sub> de las especies del Género B. Con valores IC<sub>50</sub> relativamente altos, los derivados de lúpulo BetaStab (73 µg/ml), extracto de tanino nº 4411 (59 µg/ml), Aromahop (43 µg/ml) y orujo de lúpulo nº 1115 (35 µg/ml) se clasificarían como no irritantes para la mucosa gástrica. Inesperadamente, todos los derivados de lúpulo eran esencialmente menos inhibidores para las células de la mucosa gástrica AGS que cualquier NSAID, incluyendo los nuevos fármacos altamente selectivos de COX-2 rofecoxib y celecoxib.

### Ejemplo 3: Toxicidad aguda de derivados de lúpulo del Género A y del Género B en ratas

La toxicidad aguda de los derivados de lúpulo se examinó en ratas. A diez ratas macho Fisher 344 jóvenes con un peso medio de 100 g se les administraron vía oral 5.000 mg de material de ensayo/kg de peso corporal y se observaron durante 14 días; se determinó la cantidad de ratas muertas. La baja toxicidad aguda de los derivados de lúpulo se demuestra mediante la falta de letalidad cuando se administran a las ratas vía oral a una dosis de 5.000 mg de material de ensayo/kg de peso corporal.

### Ejemplo 4: Evaluación de la sinergia de inhibición de PGE<sub>2</sub> producida por combinaciones de ácidos alfa isomerizados reducidos y ácidos alfa isomerizados en células raw 264.7

Este ejemplo describe el efecto de las combinaciones de ácidos alfa isomerizados reducidos (RIAA) y ácidos alfa isomerizados (IAA) en la inhibición de la producción de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) en el modelo de inflamación de RAW 264.7 estimulado con lipopolisacárido (LPS).

El equipo estándar utilizado en estos experimentos se describe en el Ejemplo 1. Las sustancias químicas y los reactivos de obtuvieron tal como se describe a continuación. El lipopolisacárido bacteriano (LPS; *B. coli* 055:B5) se obtuvo de Sigma (St. Louis, MO). El kit de anticuerpo monoclonal de prostaglandina E<sub>2</sub> se adquirió de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). El suero bovino fetal inactivado por calor (FBS-HI Nº Cat. 35-011CV) y el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM Nº Cat. 10-1013CV) se adquirieron de Mediatech (Herndon, VA). A no ser que se indique otra cosa, todos los reactivos estándar se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO) y eran los reactivos más puros comercialmente disponibles. Las sustancias de ensayo incluían RIAA (Redihop (ácidos rho-iso-alfa (RIA.A), 29,5 - 30,5%, <0,2% ácidos iso-alfa)) e IAA (Isohop (ácidos iso-alfa (IAA), 29,5 - 30,5%) obtenidos de Betatech Hops Products (Washington, DC).

*Cultivo celular y tratamiento con material de ensayo* - Las células RAW 264.7 (número ATCC TIB-71) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se subcultivaron de acuerdo con las instrucciones del proveedor. En la preparación para los ensayos, las células se cultivaron en medio de cultivo DMEM con 10% FBS-HI con penicilina/estreptomina y se mantuvieron en fase logarítmica antes del sistema experimental. El segundo día del experimento, las células se dispusieron en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos a razón de 8 x 10<sup>4</sup> células por pocillo con 200 µl de medio de cultivo en cada pocillo.

Después de incubación durante una noche a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, el medio de cultivo se aspiró y se sustituyó por 200 µl de DMEM sin suero bovino fetal (FBS) o penicilina/estreptomina. Los materiales de ensayo se disolvieron en sulfóxido de dimetilo (DMSO) como solución madre en un factor 250. Cuatro µl de esta preparación de material de ensayo madre en un factor 250 se añadieron a 1 ml de DMEM y 200 µl de esta solución se añadieron a pocillos por duplicado para cada dosis de material de ensayo. Las concentraciones finales del material de ensayo fueron de 10, 0,1 y 0,01 µg/ml. La Tabla 5 describe la matriz de dosificación para células RAW 264.7 tratadas con materiales de ensayo y estimulación con LPS.

## ES 2 381 190 T3

Tabla 5 Matriz de dosificación para células RAW 264.7 tratadas con material de ensayo y estimulación con LPS

Compuesto	Fracción RIAA	d1 [µg/ml]	d2 [µg/ml]	d3 [µg/ml]	d4 [µg/ml]	Nº pocillos
1. Beta Tech RIAA	1,00	10,000	1,000	0,100	0,010	8
2. Beta Tech IAA	0,00	10,000	1,000	0,100	0,010	8
3. RIAA:IAA [100:1]	0,99	10,000	1,000	0,100	0,010	
	RIAA=	9,901	0,990	0,099	0,009	8
	IAA =	0,099	0,010	0,001	0,001	
4. RIAA:IAA [10:1]	0,91	10,000	1,000	0,100	0,010	
	RIAA=	0,091	0,909	0,091	0,009	8
	IAA =	0,909	0,091	0,009	0,001	
5. RIAA:IAA [3:1]	0,75	10,000	1,000	0,100	0,010	
	RIAA=	7,500	0,750	0,075	0,0075	8
	IAA =	2,500	0,250	0,025	0,0025	
6. RIAA:IAA [3:2]	0,60	10,000	1,000	0,100	0,010	
	RIAA=	6,00	0,60	0,06	0,006	8
	IAA =	4,00	0,40	0,04	0,004	
7. RIAA:IAA [1:1]	0,50	10,000	1,000	0,100	0,010	
	RIAA=	5,00	0,50	0,05	0,005	8
	IAA =	5,00	0,50	0,05	0,005	
8. RIAA:IAA [2:3]	0,40	10,000	1,000	0,100	0,0010	
	RIAA=	4,00	0,40	0,04	0,00	8
	IAA =	6,00	0,60	0,06	0,01	
9. RIAA:IAA [1:10]	0,09	10,000	1,000	0,100	0,010	
	RIAA=	0,909	0,091	0,009	0,001	8
	IAA =	9,091	0,909	0,091	0,009	
10. RIAA:IAA [1:100]	0,010	10,000	1,000	0,100	0,010	
	RIAA=	0,10	0,01	0,001	0,0001	8
	IAA =	9,90	0,99	0,099	0,0099	

5 *Determinación de PGE<sub>2</sub>* - Para la determinación de la PGE<sub>2</sub> se utilizó un procedimiento comercial no radiactivo para la cuantificación de PGE<sub>2</sub> (Caymen Chemical, Ann Arbor, MI), aplicándose el procedimiento recomendado por el fabricante sin ninguna modificación. En resumen, 50 µl del medio de cultivo sobrenadante se diluyó con cantidades apropiadas de un trazador marcado con acetilcolinesterasa y antisuero de PGE<sub>2</sub>, y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 18 h. Después, los pocillos de la placa de microtitulación del ensayo de PGE<sub>2</sub> se vaciaron y se enjuagaron con un tampón de lavado, luego se añadieron 200 µl de reactivo de Ellman que contenía sustrato para la acetilcolinesterasa. La reacción se mantuvo en un agitador lento a temperatura ambiente durante 10 hora y se determinó la absorbancia a 415 nm en un lector de placas ELISA de Bio-tek Instruments (Modelo N° E1x800, Winooski, VT). Las especificaciones del fabricante para este ensayo incluyen un coeficiente de variación

intraensayo < 10%, reactividad cruzada con PGD2 y PGF<sub>2α</sub> de menos del 1% y una linealidad por encima del rango de 10 - 1.000 pg/ml. La concentración de PGE<sub>2</sub> se calculó como pg por 10<sup>5</sup> células, tal como se describe más abajo.

5 Para los cálculos relacionados con los ensayos de PGE<sub>2</sub> se calculó la concentración inhibidora mediana (IC<sub>50</sub>) para la síntesis de PGE<sub>2</sub> utilizando CalcuSyn (BIOSOFT, Ferguson, MO). Este paquete estadístico realiza múltiples cálculos dosis-efecto de fármaco utilizando los métodos de efecto mediano descritos por Chou y Talaly (Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55. (1984)).

10 En pocas palabras, el análisis correlaciona la "Dosis" y el "Efecto" del modo más simple posible:  $fa/fu = (C/C_m)^m$ , siendo C la concentración o dosis del compuesto y C<sub>m</sub> la dosis efectiva mediana referida a la potencia. El valor C<sub>m</sub> se determina a partir de la intersección del eje X del gráfico mediana-efecto. La fracción influida por la concentración del material de ensayo es fa y la fracción no influida por la concentración es fu ( $fu = 1-fa$ ). El exponente m es el parámetro que indica el carácter sigmoideo o la forma de la curva dosis-efecto. Se estima mediante la pendiente del gráfico mediana-efecto.

15 El gráfico mediana-efecto es un gráfico de  $x = \log(C)$  en función de  $y = \log(fa/fu)$  y se basa en la forma logarítmica de la ecuación mediana-efecto de Chou. La bondad del ajuste de los datos para la ecuación mediana-efecto está representada mediante el coeficiente de correlación lineal r del gráfico mediana-efecto. Normalmente, los datos experimentales de sistemas enzimáticos o receptores tienen un valor  $r > 0,96$ , los de cultivo de tejido un valor  $r > 0,90$  y los de sistemas animales un valor  $r > 0,85$ . En los estudios basados en células aquí descritos, todos los coeficientes de correlación lineal eran superiores a 0,90. Para obtener un resultado más sólido, los experimentos se repiten un mínimo de tres veces en tres fechas diferentes. Se calcula el promedio del porcentaje de inhibición de cada dosis de los tres experimentos independientes y se utiliza para calcular las concentraciones inhibidoras medianas que se dan a conocer aquí.

20 La sinergia de los componentes de ensayo se cuantifica utilizando el parámetro del índice de combinación (CI). El CI de Chou-Talaly se basa en el efecto múltiple del fármaco y se deriva de modelos cinéticos de enzimas (Chou y Talaly, J. Biol. Chem. 252: 6438-6442 (1977)). La ecuación sólo determina el efecto aditivo más que la sinergia o el antagonismo. No obstante, en este análisis el sinergismo se define como un efecto aditivo superior al previsto y el antagonismo se define como un efecto aditivo inferior al previsto tal como proponen Chou y Talaly. Utilizando la designación de CI = 1 como el efecto aditivo, en caso de compuestos mutuamente exclusivos que tienen el mismo modo de acción o en caso de fármacos mutuamente no exclusivos que tienen modos de acción totalmente independientes se obtienen las siguientes relaciones:  $CI < 1$ ,  $CI = 1$  y  $CI > 1$ , que indican sinergia, adición y antagonismo, respectivamente.

25 *Viabilidad de las células* - La viabilidad de las células se evaluó mediante su inspección visual antes o inmediatamente después de la toma de muestras del medio para ensayar la PGE<sub>2</sub>. Cuando se observó mortalidad celular, ésta se anotó.

30 Para los métodos estadísticos se utilizaron al menos cuatro concentraciones (Tabla 5) para calcular curvas dosis-respuesta y las concentraciones inhibidoras medianas (IC<sub>50</sub>) con intervalos de confianza del 95% utilizando CalcuSyn (BIOSOFT, Ferguson, MO). Este paquete estadístico realiza múltiples cálculos dosis-efecto de fármaco utilizando los métodos de Efecto Mediano descritos por Chou y Talaly, *supra*, 1984. Todos los datos dosis-respuesta recogieron la concentración inhibidora mediana (Apéndice B). Cuando estaba justificado se aplicaron dos transformaciones de datos. La primera transformación consistía en calcular la inhibición porcentual a partir de la producción de PGE<sub>2</sub> más alta producida a partir de la concentración de ensayo más baja cuando la producción de PGE<sub>2</sub> a estas dosis bajas superaba la producción de control estimulado con LPS. Este proceso controla la variabilidad de respuesta y los gradientes a través de la placa. La segunda transformación de datos ajusta la varianza en respuesta a las dosis progresivas. Las simulaciones de Monte Carlo utilizando la varianza histórica entre pocillos predicen que las curvas dosis-respuesta son progresivas solo el 40% del tiempo cuando se utilizan pocillos duplicados por cada concentración en una curva dosis-respuesta de cuatro puntos. Por consiguiente, en las situaciones donde la respuesta no era progresiva, antes de calcular las IC<sub>50</sub> se llevó a cabo una clasificación de la respuesta por concentración.

35 Resultados - Los valores de concentración inhibidora mediana (IC<sub>50</sub>) de RIAA e IAA de 0,24 µg/ml (límite de confianza del 95% (CL) 0,060 - 0,94 µg/ml) y 0,56 µg/ml (95% CL 0,28 - 1,1), respectivamente, obtenidos en este estudio eran coherentes con los resultados previos de este laboratorio utilizando el protocolo de una noche LPS-RAW 264.7.

40 La Tabla 6 muestra las concentraciones inhibidoras medianas para RIAA, IAA y combinaciones de RIAA:IAA en células RAW 264.7 estimuladas con LPS, con las regiones de sinergia calculadas para cada combinación. Sorprendentemente se observó sinergia en todas las combinaciones de RIAA:IAA, aunque en segmentos diferentes de las curvas dosis-respuesta. Se observaron regiones de sinergia en la parte inferior de las curvas dosis-respuesta para combinaciones de RIAA:IAA de 10:1, 1:1 y 1:100, que cubrían concentraciones de RIAA de 2,5x10<sup>-8</sup> a 0,26 µg/ml. Se observó sinergia en el extremo superior de la curva dosis-respuesta para relaciones RIAA:IAA de 100:1, 3:1, 3:2, 2:3 y 1:10, que cubrían concentraciones de 0,31 a 68,261 µg/ml. Por consiguiente, es razonable esperar

que se produzca sinergia *in vivo* en una amplia gama de dosis tanto de RIAA como de IAA independientemente de la relación de los componentes en la formulación dosificada.

Tabla 6 Concentraciones inhibitoras medianas y regiones de sinergia para RIAA, IAA y combinaciones RIAA:IAA en células RAW 264.7 estimuladas con LPS

Material de ensayo	RIAA [%]	IC <sub>50</sub> [µg/ml]	Región de sinergia RIAA [µg/ml]
RIAA	100	0,24	
IAA	0	0,56	
RIAA:IAA [100:1]	99	0,68	955 - 55655
RIAA:IAA [10:1]	91	0,28	1,1x10 <sup>-6</sup> - 0,070
RIAA:IAA [3:1]	75	1,8	8,2 - 531
RIAA:IAA [3:2]	60	1,1	10 - 5807
RIAA:IAA [1:1]	50	0,23	2,4x10 <sup>-8</sup> - 0,26
RIAA:IAA [2:3]	40	1,9	>1127
RIAA:IAA [1:10]	9,1	0,77	0,31 - 4661
RIAA:IAA [1:100]	1,0	0,60	1,5x10 <sup>-8</sup> - 6,0x10 <sup>-5</sup>
Región de sinergia definida por CI < 1,0			

5

Las células RAW 264.7 se trataron con material de ensayo 60 minutos antes de la estimulación con LPS y se incubaron durante una noche. Dieciocho horas después de la estimulación con LPS, se tomaron muestras del medio sobrenadante para la determinación de PGE<sub>2</sub>. Se calcularon las concentraciones inhibitoras medianas de un mínimo de cuatro concentraciones en dos experimentos independientes. Los CI se calcularon tal como se describe más arriba.

10

La Figura 4 muestra una representación gráfica del parámetro del Índice de Combinación calculado en función de la concentración de ácidos alfa isomerizados reducidos (RIAA), ácidos alfa isomerizados (IAA), y con relaciones RIAA:IAA de 100:1 (Figura 4A), 10:1 (Figura 4B), 3:1 (Figura 4C), 3:2 (Figura 4D), 1:1 (Figura 4E), 2:3 (Figura 4F), 1:10 (Figura 4G), 1:100 (Figura 4H).

15

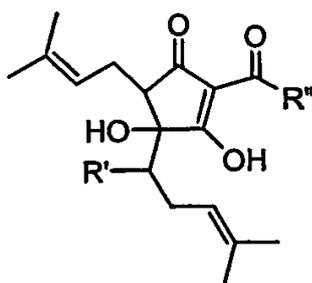
Los resultados muestran que se observó sinergia entre RIAA e IAA en cuatro combinaciones: 3:1, 3:2, 1:1 y 1:10. Con las relaciones RIAA:IAA 1:1 y 1:10 se produjo una sinergia particularmente relevante. Para estas formulaciones se observó sinergia a concentraciones de RIAA < 0,58 µg/ml y concentraciones de IAA de 0,31 µg/ml, respectivamente.

En esta solicitud se ha hecho referencia a diversas publicaciones.

20

## REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un ácido iso-alfa reducido (RIAA) y un ácido iso-alfa (IAA) derivado de lúpulo, donde:
- 5 el RIAA y el IAA están presentes en una relación de 3:1 a 1:20;
- dichos RIAA e IAA constituyen individualmente al menos un 0,1% de la composición y
- la combinación de tales RIAA e IAA en dicha composición proporciona un índice de combinación (CI) inferior a 1 en relación con la inhibición de la producción de PGE<sub>2</sub>.
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque, cuando el RIAA y el IAA están presentes en una relación 3:1, el RIAA está en una concentración de al menos 8 µg/ml.
- 10 3. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque, cuando el RIAA y el IAA están presentes en una relación 3:2, el RIAA está en una concentración de al menos 10 µg/ml.
4. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque, cuando el RIAA y el IAA están presentes en una relación 1:1, el RIAA está en una concentración de hasta 0,3 µg/ml.
- 15 5. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque, cuando el RIAA y el IAA están presentes en una relación 2:3, el RIAA está en una concentración de al menos 60 µg/ml.
6. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque, cuando el RIAA y el IAA están presentes en una relación 1:10, el RIAA está en una concentración de al menos 0,3 µg/ml.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque dicho ácido iso-alfa se selecciona de entre isohumulona, isocohumulona e isoadhumulona.
- 20 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque dicho ácido iso-alfa reducido se selecciona de entre dihidroisohumulona, dihidroisocohumulona y dihidroisoadhumulona.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque es capaz de reducir la inflamación mediada por PGE<sub>2</sub>.
- 25 10. Composición según la reivindicación 9, caracterizada porque dicho ácido iso-alfa se selecciona de entre isohumulona, isocohumulona e isoadhumulona.
11. Composición según la reivindicación 9, caracterizada porque dicho ácido iso-alfa reducido se selecciona de entre dihidroisohumulona, dihidro-isocohumulona y dihidroisoadhumulona.
12. Composición según la reivindicación 9, caracterizada porque comprende al menos dos compuestos del Género A de fórmula:

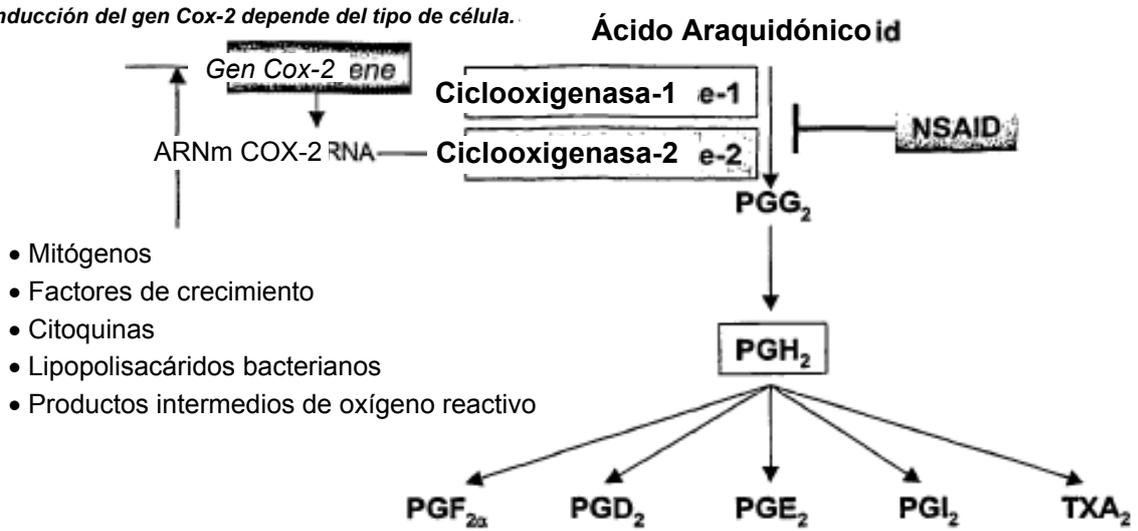


(Género A),

- 30 donde R' se selecciona entre el grupo consistente en carbonilo, hidroxilo, OR y OCOR, siendo R alquilo; y R'' se selecciona entre el grupo consistente en CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; consistiendo uno de estos dos o más compuestos del Género A en dicho RIAA y otro de estos dos o más compuestos del Género A en dicho IAA.
- 35 13. Composición que incluye un ácido iso-alfa reducido (RIAA) y un ácido iso-alfa (IAA), estando el RIAA y el IAA en una relación de 3:1 a 1:10; dichos RIAA e IAA constituyendo individualmente al menos un 0,1% de la composición; y proporcionando la combinación de dichos RIAA e IAA en dicha composición un índice de combinación (CI) inferior a 1 en relación con la inhibición de la producción de PGE<sub>2</sub>; para su uso para reducir la inflamación mediada por PGE<sub>2</sub>.

- 14. Composición a utilizar según la reivindicación 13, caracterizada porque el RIAA se selecciona de entre el grupo consistente en dihidroisohumulona, dihidroisocohumulona y dihidroisoadhumolona.
- 15. Composición a utilizar según la reivindicación 13, caracterizada porque el IAA se selecciona de entre isohumulona, isocohumulona e isoadhumolona.
- 5 16. Composición a utilizar según la reivindicación 13, caracterizada porque comprende de 50 mg a 7.500 mg del RIAA.
- 17. Composición a utilizar según la reivindicación 13, caracterizada porque comprende de 50 mg a 7.500 mg del IAA.
- 10 18. Composición a utilizar según la reivindicación 13, caracterizada porque además incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 19. Composición a utilizar según la reivindicación 13, caracterizada porque está prevista para ser administrada vía oral, tópica, parenteral o rectal.

La inducción del gen Cox-2 depende del tipo de célula.



*El orden de los eicosanoides producidos depende del tipo de célula. La respuesta celular está en función de los receptores intracelulares y extracelulares.*

Figura 1

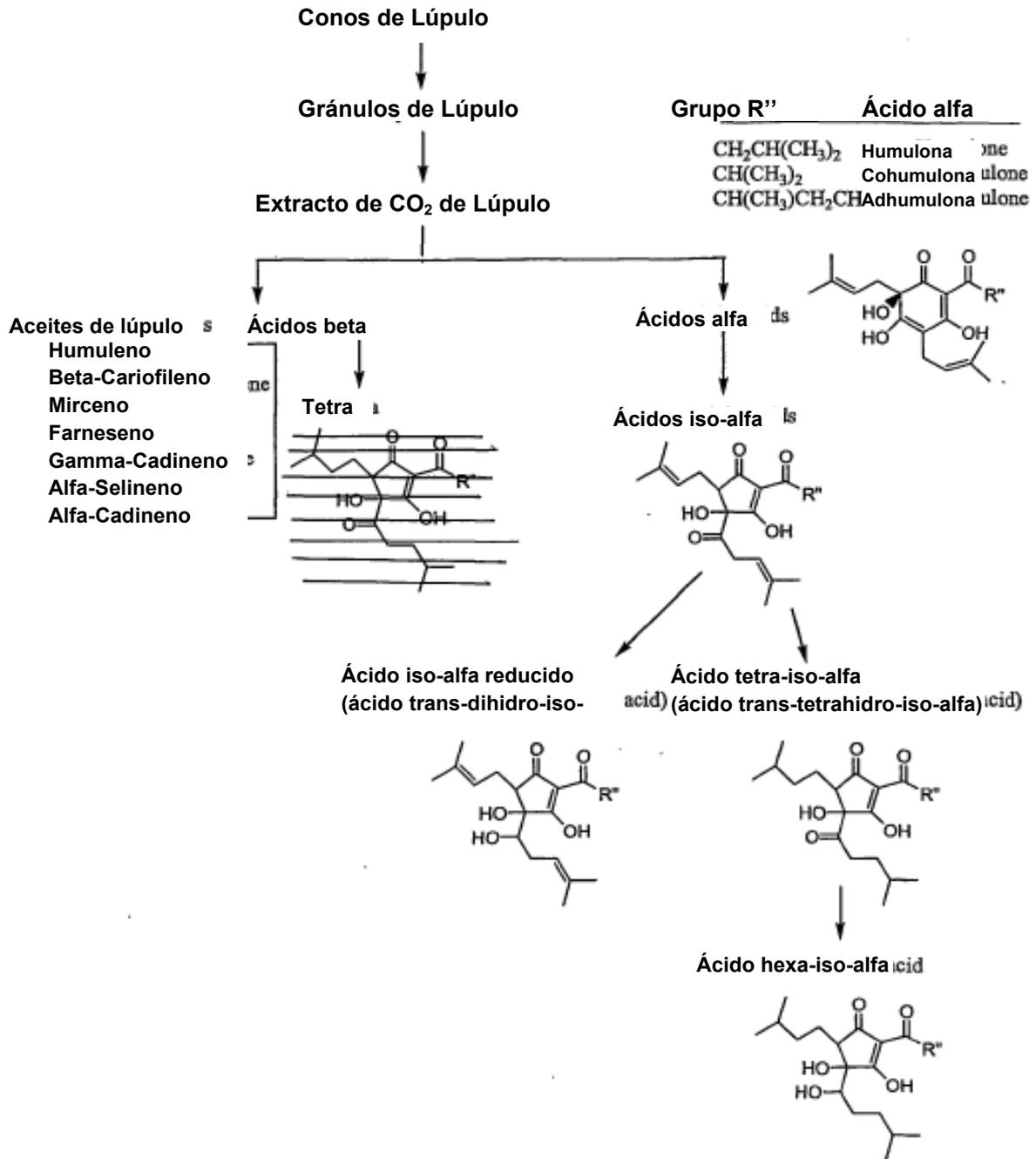


Figura 2

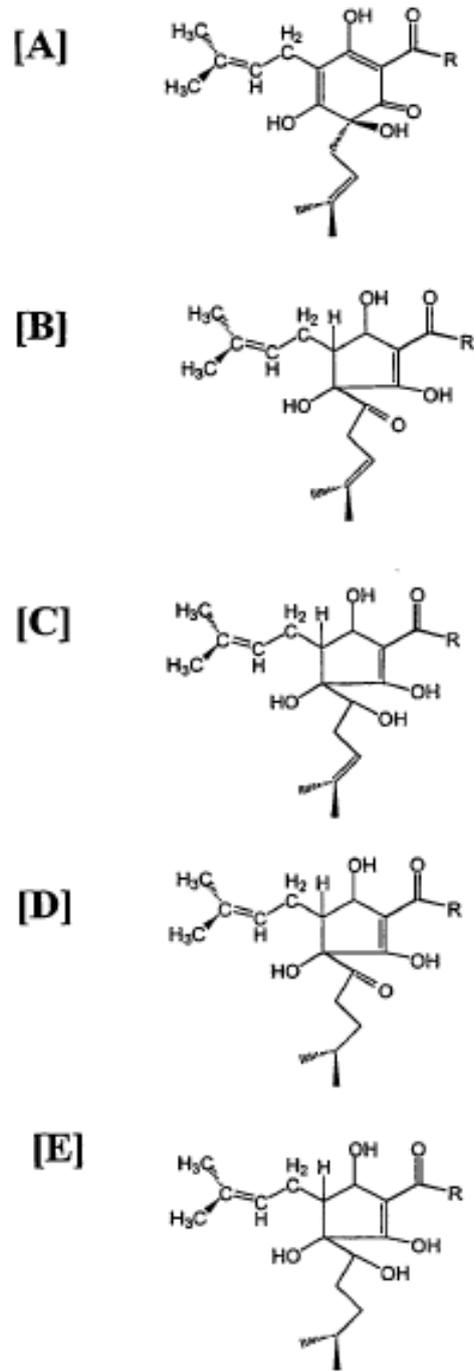
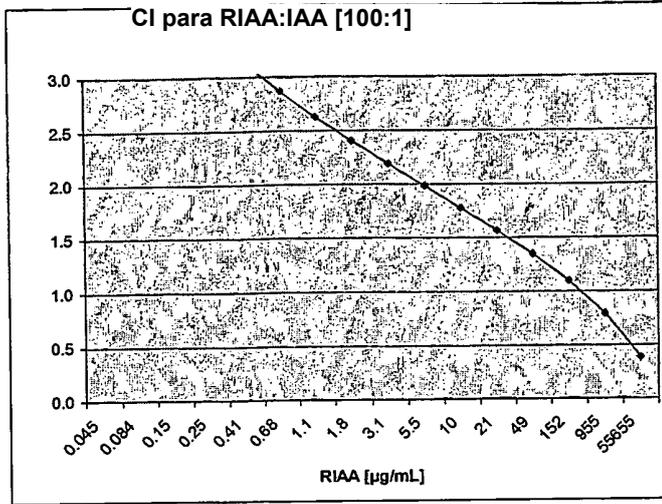


Figura 3

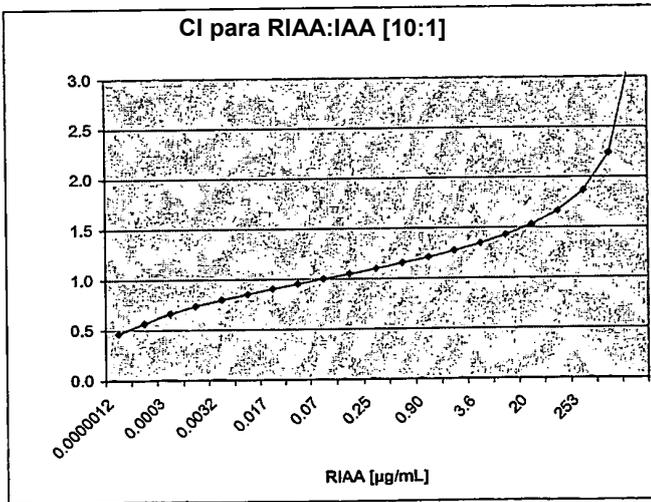
RIAA:IAA [100:1]			
Fa	CI	RIAA [µg/mL]	IAA [µg/mL]
0.02	15.805		0.000
0.05	10.414	0.00048	0.000
0.10	7.501	0.00	0.0000
0.15	6.125	0.0095	0.00009
0.20	5.258	0.022	0.00022
0.25	4.636	0.045	0.00045
0.30	4.154	0.084	0.00084
0.35	3.759	0.15	0.0015
0.40	3.424	0.25	0.0025
0.45	3.131	0.41	0.0041
0.50	2.869	0.68	0.0068
0.55	2.628	1.1	0.011
0.60	2.403	1.8	0.018
0.65	2.189	3.1	0.031
0.70	1.982	5.5	0.055
0.75	1.776	10	0.10
0.80	1.567	21	0.21
0.85	1.346	49	0.49
0.90	1.100	152	1.5
0.95	0.794	955	9.6
1.00	0.387	55655	557



El área sombreada representa la región de sinergia

Figura 4A

RIAA:IAA [10:1]			
Fa	CI	RIAA [µg/mL]	IAA [µg/mL]
0.02	0.466	0.0000012	0.000000
0.05	0.566	0.000024	0.000002
0.10	0.665	0.0003	0.000025
0.15	0.737	0.0011	0.00011
0.20	0.797	0.0032	0.00032
0.25	0.851	0.0079	0.00079
0.30	0.901	0.017	0.0017
0.35	0.950	0.04	0.0036
0.40	0.999	0.07	0.0070
0.45	1.048	0.13	0.01
0.50	1.099	0.25	0.03
0.55	1.152	0.47	0.05
0.60	1.209	0.90	0.1
0.65	1.272	1.8	0.2
0.70	1.344	3.6	0.4
0.75	1.427	7.9	1
0.80	1.530	20	2
0.85	1.664	59	6
0.90	1.862	253	25
0.95	2.236	2654	265
1.00	3.358		



El área sombreada representa la región de sinergia

Figura 4B

RIAA:IAA [3:1]			
Fa	CI	RIAA [µg/mL]	IAA [µg/mL]
0.02	4558	0.0087	0.002173
0.05	896	0.030	0.007438
0.10	253	0.078	0.020
0.15	116	0.14	0.036
0.20	65	0.22	0.056
0.25	40	0.33	0.082
0.30	26	0.45	0.113
0.35	18	0.61	0.153
0.40	13	0.80	0.200
0.45	9.1	1.00	0.25
0.50	6.541	1.4	0.34
0.55	4.704	1.8	0.44
0.60	3.362	2.3	0.58
0.65	2.370	3.0	0.76
0.70	1.632	4.1	1.0
0.75	1.083	5.7	1.4
0.80	0.678	8.2	2.1
0.85	0.385	13	3.3
0.90	0.182	24	6.0
0.95	0.054	62	16
1.00	0.004	531	133

El área sombreada representa la región de sinergia

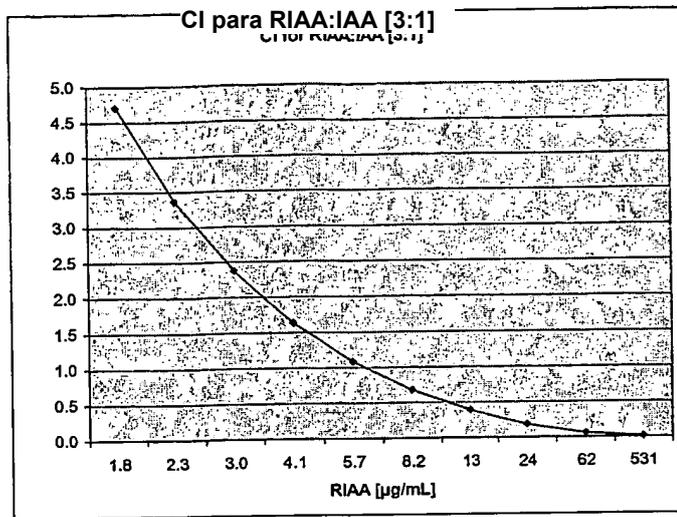


Figura 4C

RIAA:IAA [3:2]			
Fa	CI	RIAA [µg/mL]	IAA [µg/mL]
0.02	220	0.00031	0.000
0.05	78	0.0020	0.001
0.10	35	0.0087	0.003
0.15	21	0.022	0.009
0.20	15	0.043	0.017
0.25	11	0.076	0.031
0.30	8.5	0.13	0.050
0.35	6.743	0.20	0.080
0.40	5.428	0.30	0.12
0.45	4.414	0.45	0.18
0.50	3.607	0.67	0.27
0.55	2.951	1.0	0.40
0.60	2.406	1.5	0.60
0.65	1.946	2.3	0.92
0.70	1.553	3.6	1.4
0.75	1.213	5.8	2.3
0.80	0.915	10	4.0
0.85	0.652	21	8.4
0.90	0.417	51	20
0.95	0.203	223	89
1.00	0.042	5807	2323

El área sombreada representa la región de sinergia

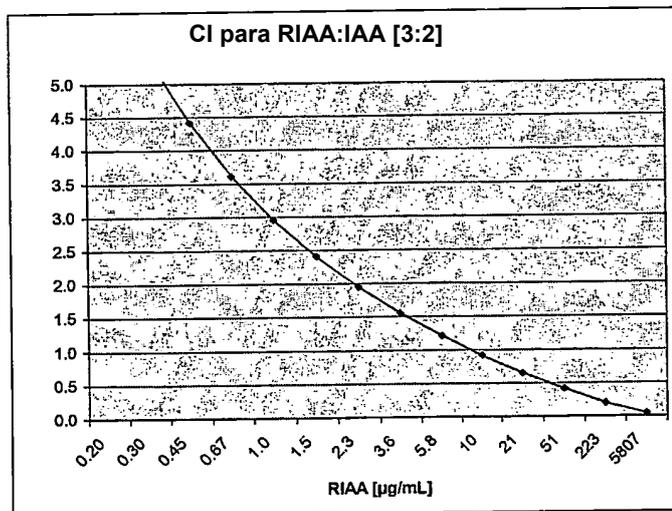


Figura 4D

RIAA:IAA [1:1]

Fa	Cl	RIAA [µg/mL]	IAA [µg/mL]
0.02	0.022	2.5*10 <sup>-8</sup>	2.5*10 <sup>-8</sup>
0.05	0.049	1.0*10 <sup>-6</sup>	1.0*10 <sup>-6</sup>
0.10	0.094	2.0*10 <sup>-5</sup>	2.0*10 <sup>-5</sup>
0.15	0.142	0.00012	0.00012
0.20	0.194	0.00049	0.00049
0.25	0.252	0.0015	0.0015
0.30	0.317	0.0041	0.0041
0.35	0.392	0.010	0.010
0.40	0.478	0.024	0.024
0.45	0.579	0.053	0.05
0.50	0.699	0.12	0.12
0.55	0.846	0.3	0.3
0.60	1.028	0.6	0.6
0.65	1.262	1.3	1.3
0.70	1.573	3	3
0.75	2.007	9	9
0.80	2.656	28	28
0.85	3.743	110	110
0.90	5.92	687	687
0.95	12.507	13152	13152
1.00	67		

El área sombreada representa la región de sinergia

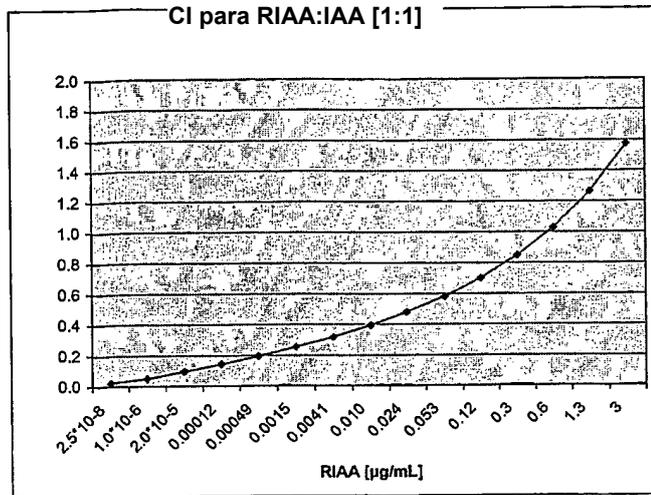


Figura 4E

RIAA:IAA [2:3]

Fa	Cl	RIAA [µg/mL]	IAA [µg/mL]
0.02	56	4.7*10 <sup>-5</sup>	7.0*10 <sup>-5</sup>
0.05	30	0.00049	0.00082
0.10	18	0.0032	0.0053
0.15	14	0.010	0.017
0.20	11	0.024	0.040
0.25	10	0.049	0.081
0.30	8	0.091	0.15
0.35	7.266	0.16	0.27
0.40	6.436	0.27	0.45
0.45	5.738	0.45	0.76
0.50	5.133	0.75	1.2
0.55	4.598	1.2	2.1
0.60	4.114	2.0	3.4
0.65	3.669	3.5	5.8
0.70	3.251	6.1	10
0.75	2.851	11	18
0.80	2.458	23	38
0.85	2.060	56	93
0.90	1.636	176	293
0.95	1.140	1127	1878
0.99	0.531	68261	113768

El área sombreada representa la región de sinergia

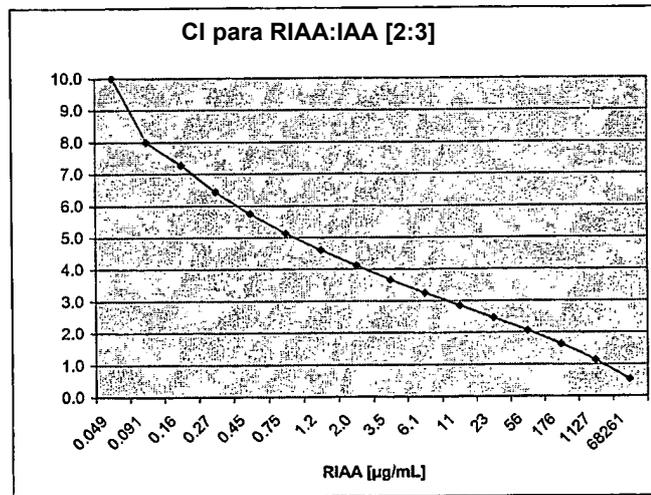


Figura 4F

RIAA:IAA [1:10]

Fa	CI	RIAA [µg/mL]	IAA [µg/mL]
0.02	35.000	5.7*10 <sup>-6</sup>	5.7*10 <sup>-5</sup>
0.05	16.000	5.7*10 <sup>-5</sup>	5.7*10 <sup>-4</sup>
0.10	8.737	0.00034	0.0034
0.15	6.023	0.0011	0.0110
0.20	4.560	0.0025	0.0245
0.25	3.628	0.0049	0.049
0.30	2.975	0.0090	0.090
0.35	2.486	0.016	0.16
0.40	2.104	0.026	0.3
0.45	1.794	0.043	0.4
0.50	1.535	0.070	0.7
0.55	1.315	0.11	1.1
0.60	1.124	0.19	1.9
0.65	0.956	0.31	3.1
0.70	0.804	0.54	5.4
0.75	0.666	1.0	10
0.80	0.537	2.0	20
0.85	0.416	4.6	46
0.90	0.298	14	140
0.95	0.176	86	860
0.99	0.058	4661	46610

El área sombreada representa la región de sinergia

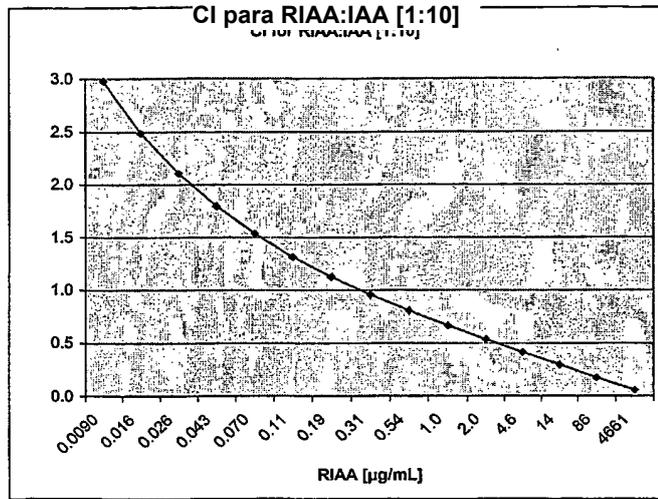


Figura 4G

RIAA:IAA [1:100]

Fa	CI	RIAA [µg/mL]	IAA [µg/mL]
0.02	0.856	1.5*10 <sup>-8</sup>	5.7*10 <sup>-9</sup>
0.05	0.903	3.4*10 <sup>-7</sup>	6.7*10 <sup>-7</sup>
0.10	0.943	4.1*10 <sup>-6</sup>	0.00041
0.15	0.969	1.9*10 <sup>-5</sup>	0.0019
0.20	0.989	6.0*10 <sup>-5</sup>	0.0060
0.25	1.006	0.00016	0.016
0.30	1.022	0.00036	0.036
0.35	1.036	0.0008	0.08
0.40	1.050	0.0015	0.15
0.45	1.063	0.0030	0.30
0.50	1.076	0.0059	0.6
0.55	1.090	0.012	1.2
0.60	1.105	0.023	2.3
0.65	1.120	0.046	4.6
0.70	1.137	0.10	10
0.75	1.156	0.23	23
0.80	1.178	0.59	58.5
0.85	1.207	1.9	190
0.90	1.247	8.6	860
0.95	1.319	102	10200
1.00	1.519	24285	2428500

El área sombreada representa la región de sinergia

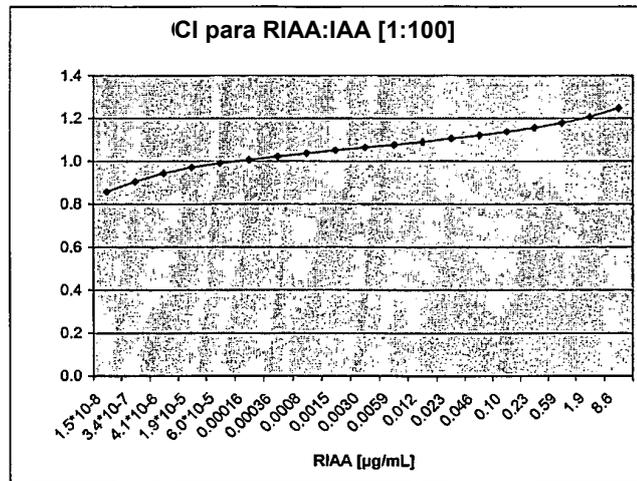


Figura 4H