

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 174**

51 Int. Cl.:

A61K 36/28 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2006 E 06809434 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 1931366**

54 Título: **Composición herbácea para trastornos inflamatorios**

30 Prioridad:

**30.09.2005 IN MU12262005
14.11.2005 US 736443 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.10.2013

73 Titular/es:

**PIRAMAL LIFE SCIENCES LIMITED (100.0%)
PIRAMAL TOWER GANPATRAO KADAM MARG.
LOWER PAREL
MUMBAI 400 013 MAH, IN**

72 Inventor/es:

**CHAUHAN, VIJAY;
SUTHAR, ASHISH;
SAPRE, DHANANJAY;
BAL-TEMBE, SWATI;
GANGOPADHYAY, ASHOK KUMAR;
KULKARNI-ALMEIDA, ASHA y
PARIKH, SAPNA HASIT**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 426 174 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 herbácea para trastornos inflamatorios

5 **Campo de la invención**

[001] La presente divulgación se refiere a una composición herbácea que comprende un extracto de capítulos florales y fructíferos de una planta, *Sphaeranthus indicus*. Adicionalmente se refiere a una composición herbácea que contiene un extracto obtenido de los capítulos florales y fructíferos de *Sphaeranthus indicus*, que como un marcador bioactivo comprende un compuesto, 3a-hidroxi-5a,9-dimetil-3-metilen-3a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahidro-3H-nafto[1,2-b]furan-2-ona (7-hidroxi-4,11(13)-eudesmadien-12,6-olida) (compuesto 1) y opcionalmente otro activo (o activos) para el tratamiento eficaz de trastornos inflamatorios. La presente divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que como un ingrediente activo comprende 3a-hidroxi-5a,9-dimetil-3-metilen-3a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahidro-3H-nafto[1,2-b]furan-2-ona (compuesto 1) y vehículos farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios. También se refiere a un método de fabricación de las composiciones. Las composiciones de la presente invención están adaptadas para el tratamiento de trastornos inflamatorios. La invención también se refiere a la actividad inhibidora del factor $-\alpha$ de necrosis tumoral (TNF- α) e interleucina (IL-1, IL-6, IL-8) de las composiciones. La presente invención se refiere adicionalmente a la inhibición de la expresión de la molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1), la molécula 1 de adhesión celular-vascular (VCAM-1) y E-Selectina por las -composiciones.

[002] La invención también desvela usos médicos de las composiciones para el tratamiento de trastornos inflamatorios. Opcionalmente, el extracto o composición que comprende el compuesto 1 puede usarse en combinación con al menos cualquier otro agente antiinflamatorio.

25

Antecedentes de la invención

[003] La inflamación desempeña una función fundamental en las defensas del hospedador y en el desarrollo de la enfermedad inmunomediada. La respuesta inflamatoria se inicia en respuesta a lesiones (por ejemplo traumatismo, isquemia y partículas extrañas) e infección (por ejemplo infección bacteriana o viral) por acontecimientos múltiples, incluyendo mediadores químicos (por ejemplo citocinas y prostaglandinas) y células inflamatorias (por ejemplo leucocitos). Se caracteriza por flujo sanguíneo aumentado en los tejidos, lo que produce pirexia, eritema, endurecimiento y dolor. Una delicada interacción bien equilibrada entre elementos inmunitarios humorales y celulares en la respuesta inflamatoria permite la eliminación de agentes nocivos y el inicio de la restauración del tejido dañado. Cuando esta delicada interacción equilibrada se altera, la respuesta inflamatoria puede producir daños considerables a tejidos normales y puede ser más nociva que la agresión original que inicia la reacción. En estos casos de respuestas inflamatorias descontroladas, se necesita intervención clínica para impedir la lesión tisular y la disfunción orgánica. Enfermedades tales como artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad de Crohn, asma, alergias, síndrome de choque séptico, aterosclerosis, enfermedad intestinal inflamatoria, entre otras afecciones clínicas, se caracterizan por inflamación crónica.

35

[004] Las citocinas, especialmente IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α , desempeñan una importante función en el proceso inflamatorio.

[005] Los macrófagos producen principalmente TNF- α , una citocina pleiotrópica, pero también pueden producirla otros tipos de células. El TNF- α demuestra actividades beneficiosas así como patológicas. Tiene efectos tanto estimulantes del crecimiento como propiedades inhibitorias del crecimiento, además de ser autorreguladora. Las funciones beneficiosas del TNF- α incluyen el mantenimiento de la homeostasis regulando el ritmo circadiano del organismo, generando una respuesta inmunitaria frente a infecciones bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias, sustituyendo o remodelando tejido lesionado estimulando el crecimiento de fibroblastos y como sugiere el nombre, destruyendo determinados tumores.

45

[006] Aunque el TNF- α desempeña una función crítica en las respuestas inmunitarias innatas y adquiridas, la producción inapropiada del TNF- α puede producir cambios patológicos que dan como resultado la inflamación crónica y el daño tisular. Se ha demostrado que el TNF- α desempeña una función crucial en la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias crónicas tales como enfermedad intestinal inflamatoria, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis psoriásica, osteoartritis, artritis reumatoide refractaria, artritis no reumatoide crónica, osteoporosis, reabsorción ósea, cardiopatía coronaria, vasculitis, colitis ulcerosa, psoriasis, síndrome de distrés respiratorio del adulto, diabetes, trastornos de hipersensibilidad cutánea de tipo retardado y enfermedad Alzheimer. La interleucina-1 (IL-1) es una parte importante del sistema inmunitario innato, que regula funciones del sistema inmunoadaptativo. El equilibrio entre IL-1 y antagonistas de receptores de IL-1 (IL-1ra) en tejidos locales influye en el posible desarrollo de una enfermedad inflamatoria y daño estructural resultante. En presencia de una cantidad en exceso de IL-1, pueden desarrollarse trastornos inflamatorios e inmunitarios en articulaciones, pulmones, tracto gastrointestinal, sistema nervioso central (SNC) o vasos sanguíneos.

55

60

65

5 [007] Entre los diversos trastornos inflamatorios, la artritis reumatoide (AR) es un trastorno autoinmunitario. La AR es una enfermedad inflamatoria articular, crónica, sistémica, de etiología desconocida. En la AR, la pared sinovial normalmente fina de las articulaciones se sustituye por un tejido de fibrocolagenasa invasor, inflamatorio, muy vascularizado (paño), que destruye tanto al cartílago como al hueso. Las zonas que pueden verse afectadas incluyen las articulaciones de las manos, muñecas, cuello, mandíbula, codos, rodilla, pies y tobillos. La destrucción del cartílago en la AR está relacionada con la expresión aberrante de citocinas y factores de crecimiento en las articulaciones afectadas.

10 [008] Dos citocinas clínicamente importantes liberadas en la membrana sinovial son la IL-1 β y el TNF- α . El TNF- α puede regular positivamente su propia expresión así como facilitar la expresión de otros genes implicados en la AR, incluyendo IL-1 β , IL-6, IL-8, ciclooxigenasa-2 (COX-2), óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1), molécula 1 de adhesión vascular-celular (VCAM-1) y E-Selectina. Este tipo de bucle regulador positivo puede amplificar y perpetuar respuestas inflamatorias locales. Por lo tanto, la sobreexpresión o expresión inapropiada de TNF- α conduce a un aumento coordinado en la expresión de muchos genes cuyos productos median respuestas inflamatorias e inmunitarias y por lo tanto conducen a las manifestaciones clínicas de la AR.

20 [009] La acumulación y retención de leucocitos es un acontecimiento crítico en la patogénesis de todos los trastornos inflamatorios crónicos incluyendo la AR. Además, la adhesión de leucocitos circulantes, especialmente monocitos, en el endotelio vascular es también un acontecimiento crucial en el desarrollo de la aterosclerosis. Este proceso depende de la interacción entre las moléculas de adhesión expresadas sobre la superficie de células endoteliales tales como ICAM-1, VCAM-1 y E-Selectina y sus ligandos afines en leucocitos. Por tanto, la ICAM-1, VCAM-1 y E-Selectina son responsables de la acumulación de células inflamatorias, tales como neutrófilos, eosinófilos y linfocitos T, desde la circulación al sitio de inflamación. Estas proteínas de adhesión están normalmente a bajo nivel en la superficie de células endoteliales pero están enormemente inducidas por diversas citocinas proinflamatorias tales como TNF- α .

30 [0010] La terapia más habitual para el tratamiento de los trastornos inflamatorios implica el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) por ejemplo naproxeno, diclofenaco, ibuprofeno para aliviar síntomas tales como dolor. Sin embargo, a pesar del amplio uso de los AINE, muchos individuos no pueden tolerar las dosis necesarias para tratar el trastorno durante un periodo de tiempo prolongado ya que se sabe que los AINE producen úlceras gástricas. Además, los AINE solo tratan los síntomas del trastorno y no la causa.

35 [0011] Cuando los pacientes no responden a los AINE, se usan otros fármacos tales como metotrexato, sales de oro, D-penicilamina y corticoesteroides. Estos fármacos también tienen efectos tóxicos significativos.

40 [0012] Los fármacos de anticuerpos monoclonales tales como infliximab, etanercept y adalimumab son útiles como agentes antiinflamatorios, pero presentan inconvenientes tales como la vía de administración (solo parenteral), un alto coste, inducción de alergias, activación de tuberculosis latente, aumento del riesgo de cáncer y cardiopatía congestiva.

45 [0013] Por tanto, existe una necesidad para el desarrollo de medicamentos mejorados y alternativos que reduzcan los efectos secundarios para la prevención y el tratamiento de trastornos inflamatorios producidos por un aumento de IL-1 y TNF- α .

[0014] En todo el mundo se conocen y se usan plantas herbáceas para el tratamiento de muchas afecciones. Es obvio que productos derivados de plantas tienen posibles efectos farmacológicos y terapéuticos en mamíferos y tienden a tener menos efectos secundarios nocivos en comparación con los fármacos sintéticos.

50 [0015] La presente invención describe una nueva composición herbácea, que comprende extractos de capítulos florales y fructíferos de la planta *Sphaeranthus indicus*. La composición puede usarse para el tratamiento de diversos trastornos inflamatorios con mínimos efectos secundarios.

55 [0016] *Sphaeranthus indicus* es una maleza común encontrada en campos de arroz. Pertenece a la familia Asteraceae y en la bibliografía de Ayurveda, se conoce como mahamundi o gorakhmundi. La planta, disponible en la India, es una planta herbácea ramificada con flores de color púrpura. Se usa en trastornos hepáticos y gástricos. Se usa en medicina tradicional como un remedio para diversas dolencias incluyendo disentería, dolor en útero y vagina, enfermedades torácicas, purificación y enriquecimiento de sangre, infecciones del tracto urinario, curación de heridas y diversas otras enfermedades.

60 [0017] Con el fin de contrarrestar trastornos inmunodeficientes (Indian Journal of Pharmacology, 33, 454-55, (2001)) se ha desarrollado una formulación poli herbácea "RV-08", que contiene *Sphaeranthus indicus*.

65 [0018] Se ha descrito el aislamiento de un nuevo sesquiterpeno glucósido, la sphaeranthanólida, procedente de las flores de *Sphaeranthus indicus*. El compuesto aislado, la Sphaeranthanólida, presenta actividad

inmunoestimuladora. (Phytochemistry, 29, 2573-76, (1990)).

[0019] Se ha descrito la actividad inmunomoduladora del extracto de metanol de los capítulos florales de *Sphaeranthus indicus* (Ars Pharmaceutica 45:3; 281-91, (2004)).

[0020] El extracto acuoso obtenido de las raíces de *Sphaeranthus indicus* se indica que es moderadamente activo en la regulación negativa de la producción de TNF- α e IL-8 inducida en *Propionibacterium acnes*. *Sphaeranthus indicus* produce una supresión más pequeña, no obstante significativa, de especies reactivas de oxígeno (Phytomedicine, 10(1), 34-38, (2003)).

[0021] Por lo que se sabe, no existen descripciones de ningún medicamento que contenga extracto de capítulos florales y fructíferos de *Sphaeranthus indicus* para el tratamiento de trastornos inflamatorios. Para superar los problemas de los efectos secundarios de la línea de tratamiento actual, tales como inducción de alergia, activación de tuberculosis latente, mielosupresión, aumento del riesgo de cáncer y cardiopatía congestiva, asociada con las composiciones de la técnica anterior, los autores de la presente invención han preparado una nueva composición herbácea eficaz contra la inflamación, que tiene actividad inhibitoria contra TNF- α , interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8) y la expresión de la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1), molécula 1 de adhesión vascular-celular (VCAM-1) y E-Selectina. Las composiciones de la presente invención también pueden usarse en combinación con al menos otro agente antiinflamatorio.

Objetos de la invención

[0022] Un objeto de la presente divulgación se refiere a proporcionar una composición herbácea que comprende, como ingrediente activo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto de capítulos florales y fructíferos de *Sphaeranthus indicus* junto con vehículos farmacéuticamente aceptables.

[0023] Otro aspecto es proporcionar una composición que comprende, como ingrediente activo, una cantidad terapéuticamente eficaz de 3a-hidroxi-5a,9- dimetil-3-metilen-3a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahidro-3H-nafto[1,2-b]furan-2-ona (compuesto 1) junto con vehículos farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de trastornos inflamatorios.

[0024] Otro aspecto adicional de la presente divulgación es proporcionar un método de fabricación de las composiciones.

[0025] Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición que comprenda una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo seleccionado de cualquier extracto de *Sphaeranthus indicus* o el compuesto 1 para su uso en el tratamiento de trastornos mediados por TNF- α e interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8).

[0026] Aún otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar una composición que comprenda una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo seleccionado de cualquier extracto de *Sphaeranthus indicus* o el compuesto 1, para su uso en el tratamiento de trastornos mediados por la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1), la molécula 1 de adhesión vascular-celular (VCAM-1) y E-Selectina.

[0027] Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar una composición que comprenda una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo seleccionado de cualquier extracto de *Sphaeranthus indicus* o el compuesto 1 para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios.

[0028] Aún otro objeto de la presente divulgación es proporcionar una composición que comprenda una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo seleccionado de cualquier extracto de *Sphaeranthus indicus* o el compuesto 1, para tratar trastornos inflamatorios mediados por TNF- α .

[0029] Aún otro objeto de la presente divulgación es proporcionar una composición que comprenda una cantidad eficaz del ingrediente activo seleccionado de cualquier extracto de *Sphaeranthus indicus* o el compuesto 1, para tratar trastornos inflamatorios mediados por interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8).

[0030] Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición que comprenda una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo seleccionado de cualquier extracto de *Sphaeranthus indicus* o el compuesto 1, para tratar trastornos inflamatorios mediados por la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1), la molécula 1 de adhesión vascular-celular (VCAM-1) y E-Selectina.

[0031] Aún otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición que comprenda una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo seleccionado de cualquier extracto de *Sphaeranthus indicus* o el compuesto 1 en combinación con al menos una sustancia bioactiva para obtener un efecto sinérgico.

[0032] Aún otro objetivo de la presente invención es proporcionar el uso de dichas composiciones en solitario o en combinación con al menos otro agente antiinflamatorio para tratar trastornos inflamatorios, incluyendo artritis reumatoide.

[0033] Otros objetos y ámbitos de aplicabilidad adicionales de la presente invención resultarán obvios a partir de la siguiente descripción detallada.

5 Sumario de la invención

[0034] Por tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición herbácea que comprende, como ingrediente activo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto de capítulos florales y fructíferos de *Sphaeranthus indicus* junto con vehículos farmacéuticamente aceptables.

[0035] De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, como ingrediente activo, se proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de 3a-hidroxi-5a,9-dimetil-3-metilen-3a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahidro-3H-nafto[1,2-b] furan-2-ona (compuesto 1) junto con vehículos farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de trastornos inflamatorios.

[0036] De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un método de fabricación de las composiciones.

[0037] De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo seleccionado de cualquier extracto de *Sphaeranthus indicus* o el compuesto 1 para el tratamiento de trastornos inflamatorios.

[0038] De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona una composición que comprende una cantidad del ingrediente activo seleccionado de cualquier extracto de *Sphaeranthus indicus* o el compuesto 1, para tratar trastornos inflamatorios mediados por TNF- α .

[0039] De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo seleccionado de cualquier extracto de *Sphaeranthus indicus* o el compuesto 1, para tratar trastornos inflamatorios mediados por interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8).

[0040] De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo seleccionado de cualquier extracto de *Sphaeranthus indicus* o el compuesto 1, para tratar trastornos inflamatorios mediados por la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1), la molécula 1 de adhesión vascular-celular (VCAM-1) y E-Selectina.

[0041] De acuerdo con otro aspecto adicional, se proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo seleccionado de cualquier extracto de *Sphaeranthus indicus* o el compuesto 1 en combinación con al menos una sustancia bioactiva para obtener un efecto sinérgico. De acuerdo con otro aspecto adicional, se proporciona un uso de las composiciones en solitario o en comparación con al menos otro agente antiinflamatorio para tratar trastornos inflamatorios incluyendo artritis reumatoide.

Descripción detallada de la invención

[0042] Basándose en la descripción del presente documento, un experto en la técnica puede utilizar la presente invención a su más alto nivel. Las siguientes realizaciones específicas deben considerarse como meramente ilustrativas y de ningún modo en absoluto no limitativas de la restante divulgación.

[0043] A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece la invención.

[0044] La expresión "trastorno inflamatorio", como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad o afección caracterizada por inflamación crónica que incluye, pero sin limitación, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis reumatoide juvenil, artritis psoriásica, artritis reumatoide refractaria, artritis no reumatoide crónica, osteoporosis/reabsorción ósea, cardiopatía coronaria, aterosclerosis, vasculitis, colitis ulcerosa, psoriasis, enfermedad de Crohn, síndrome de distrés respiratorio del adulto, síndrome de choque séptico y enfermedad intestinal inflamatoria.

[0045] La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa que el vehículo, diluyente, excipientes, y/o sales deben ser compatibles con el resto de ingredientes de la formulación y no perjudiciales para su receptor.

[0046] La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa un material encapsulante, un diluyente, un semi-sólido, un sólido no tóxico, sólido, inerte o una formulación auxiliar de cualquier tipo. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables

son azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tal como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; malta; gelatina; talco; así como otros lubricantes compatibles no tóxicos, tales como, laurilsulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, agentes aromatizantes y perfumantes; conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición, de acuerdo con el criterio del formulador.

[0047] La expresión, “cantidad terapéuticamente eficaz”, como se usa en el presente documento, significa una cantidad del compuesto o composición (por ejemplo, el extracto de *Sphaeranthus indicus*) suficiente para inducir significativamente una modificación positiva en la afección a regular o a tratar, pero lo suficientemente baja para impedir efectos secundarios, si los hubiere (a una relación beneficio/riesgo razonable), dentro del ámbito del buen criterio médico. La cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o composición variará con la afección particular que vaya a tratarse, la edad y estado físico del usuario final, la gravedad de la afección que vaya a tratarse/prevenirse, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia simultánea, el compuesto o composición específicos empleados, el vehículo particular farmacéuticamente aceptable utilizado y factores similares. Como se usa en el presente documento, todos los porcentajes son en peso a menos que se especifique de otra manera.

[0048] La expresión “marcador bioactivo” se usa en el presente documento para definir una característica (o un perfil fitoquímico) que se correlaciona con un grado de actividad farmacéutica aceptable.

[0049] La “dosis máxima practicable” es la mayor cantidad de un fármaco que un adulto puede tomar con seguridad.

[0050] Debe observarse que, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “uno”, “una” y “el”, “la” incluyen referentes en plural, salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

[0051] “Extracto de *Sphaeranthus indicus*” o “un extracto de *Sphaeranthus indicus*”, mencionado en el presente documento, significa una combinación de compuestos presentes en la planta *Sphaeranthus indicus*. Dichos compuestos se extraen de capítulos florales y fructíferos secos de la planta usando procedimientos de extracción bien conocidos en la técnica (por ejemplo, el uso de disolventes orgánicos, tales como alcoholes inferiores, alquilésteres, alquiléteres, alquilcetonas, cloroformo, éter de petróleo, hexano y/o disolventes inorgánicos, tal como agua). El presente proceso para la extracción de derivados fitoconstituyentes de capítulos florales y fructíferos de *Sphaeranthus indicus* puede aumentarse gradualmente para una preparación a gran escala.

[0052] La expresión “ingrediente activo”, como se usa en el presente documento, se refiere al “extracto de *Sphaeranthus indicus*” o “al compuesto 1” o a “un extracto enriquecido de *Sphaeranthus indicus* que contiene una mezcla de dos o más compuestos activos”.

[0053] El extracto de *Sphaeranthus indicus* puede estandarizarse usando técnicas convencionales tales como Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) o Cromatografía en Capa Fina de Alto Rendimiento (HPTLC).

[0054] En una realización, se proporciona una composición herbácea que comprende un extracto estandarizado de *Sphaeranthus indicus* junto con vehículos farmacéuticamente aceptables.

[0055] A partir de los capítulos florales y fructíferos de *Sphaeranthus indicus* pueden aislarse compuestos marcadores bioactivos mediante purificación cromatográfica en columna guiada por bioactividad y HPLC preparativa. Los compuestos pueden caracterizarse por análisis de datos espectrales.

[0056] La composición herbácea comprende, como marcador bioactivo, un extracto de capítulos florales y fructíferos de *Sphaeranthus indicus*, que comprende del 2-9% de 3a-hidroxi-5a,9-dimetil-3-metilen-3a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahidro-3H-nafto[1,2-b]furan-2-ona (compuesto 1) y opcionalmente otro activo (o activos).

[0057] En una realización, la divulgación proporciona una composición que comprende 3a-hidroxi-5a,9-dimetil-3-metilen-3a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahidro-3H-nafto[1,2-b]furan-2-ona (compuesto 1) como ingrediente activo, junto con vehículos farmacéuticamente aceptables.

[0058] En una realización, se proporciona el uso de la composición que comprende 3a-hidroxi-5a,9-dimetil-3-metilen-3a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahidro-3H-nafto[1,2-b]furan-2-ona (compuesto 1) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos inflamatorios.

[0059] La divulgación se refiere adicionalmente a un método de fabricación de composiciones útiles para el tratamiento de trastornos inflamatorios. El extracto estandarizado de *Sphaeranthus indicus* se mezcla con vehículos farmacéuticamente aceptables y se formula en formas de dosificación terapéutica. La dosis a administrar diariamente debe seleccionarse para satisfacer el efecto deseado.

[0060] En una realización, se proporciona la composición herbácea que comprende el extracto estandarizado de *Sphaeranthus indicus* para el tratamiento de trastornos inflamatorios.

[0061] En otra realización, se proporciona la composición que comprende 3a-hidroxi-5a,9-dimetil-3-metilen-3a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahidro-3H-nafto[1,2-b]furan-2-ona (compuesto 1), junto con vehículos farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de trastornos inflamatorios.

[0062] El compuesto 1, 3a-hidroxi-5a,9-dimetil-3-metilen-3a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahidro-3H-nafto[1,2-b]furan-2-ona, se aisló del extracto de *Sphaeranthus indicus* mediante un procedimiento conocido en la técnica relacionada y se caracterizó por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y espectrometría de Masas. La composición comprende el compuesto 1, 3a-hidroxi-5a,9-dimetil-3-metilen-3a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahidro-3H-nafto[1,2-b]furan-2-ona, cuyo compuesto también puede obtenerse a partir de otras fuentes vegetales o puede fabricarse mediante métodos sintéticos convencionales conocidos por un experto en la técnica.

[0063] Por consiguiente, la presente divulgación incluye, dentro de su ámbito, una composición farmacéutica que comprende el compuesto 1, que puede obtenerse a partir de otras fuentes, para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios.

[0064] En otra realización adicional, se proporciona un método de fabricación de una composición farmacéutica que comprende 3a-hidroxi-5a,9-dimetil-3-metilen-3a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahidro-3H-nafto[1,2-b]furan-2-ona (compuesto 1) mezclando el compuesto 1 con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y formulando en formas de dosificación terapéutica. La dosis a administrar diariamente se selecciona para satisfacer el efecto deseado.

[0065] Las composiciones de la presente divulgación pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, en forma de píldoras, comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas, gránulos, elixires o jarabe.

[0066] El extracto de capítulos florares y fructíferos de *Sphaeranthus indicus* se usa para preparar preparaciones orales que contienen del 3-70% en peso del extracto, que se combina cuidadosamente en una base convencional como se describirá con detalle más adelante en el presente documento. El extracto de capítulos florares y fructíferos que contiene, como marcador bioactivo, del 2-9% (p/p) del compuesto 1, es suficiente para conseguir los resultados deseados.

[0067] El compuesto 1, 3a-hidroxi-5a,9-dimetil-3-metilen-3a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahidro-3H-nafto[1,2-b]furan-2-ona, se usa para preparar preparaciones orales que contienen del 3-99% en peso del compuesto, que se combina cuidadosamente en una base convencional como se describirá con detalle más adelante en el presente documento.

[0068] Las composiciones pueden usarse para administración tópica y transdérmica. Las composiciones tópicas útiles en la presente invención implican formulaciones adecuadas para aplicación tópica en la piel. Las combinaciones pueden formularse en una amplia diversidad de tipos de productos que incluyen, pero sin limitación, lociones, cremas, geles, barras, pulverizadores o pomadas.

[0069] El extracto de capítulos florares y fructíferos de *Sphaeranthus indicus* se usa para preparar preparaciones tópicas que contienen del 1-15% en peso del extracto que se combina cuidadosamente en una base convencional como se describirá con detalle más adelante en el presente documento. El extracto de capítulos florares y fructíferos de *Sphaeranthus indicus*, que contiene, como marcador bioactivo, aproximadamente del 2-9% (p/p) del compuesto 1, es suficiente para conseguir los resultados deseados.

[0070] En una realización, las composiciones se proporcionan para el tratamiento de trastornos inflamatorios mediados por TNF- α e interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8).

[0071] En una realización las composiciones se proporcionan para el tratamiento de trastornos inflamatorios mediados por la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1), molécula 1 de adhesión vascular/celular (VCAM-1), y E-Selectina.

[0072] Los niveles de dosificación reales del ingrediente activo, "extracto de *Sphaeranthus indicus*" o el compuesto 1 en las composiciones de la presente invención pueden modificarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular.

[0073] El nivel de dosificación seleccionado dependerá de diversos factores, incluyendo la actividad del ingrediente activo particular, del "extracto de *Sphaeranthus indicus*" o "el compuesto 1" empleado, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción de la composición particular que vaya a tratarse, la duración del tratamiento, el uso en combinación con los otros extractos, la edad, sexo, peso, afección, salud general e historial médico anterior del paciente que vaya a tratarse y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

[0074] En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende el ingrediente activo,

“extracto de *Sphaeranthus indicus*” o el compuesto 1, en combinación con al menos otro extracto herbáceo que presente actividad antiinflamatoria para obtener un efecto sinérgico. Dichas otras plantas pueden seleccionarse de plantas tales como *Curcuma longa* y *Zingiber officinale*.

5 **[0075]** En otra realización adicional, la composición también comprende el ingrediente activo, “extracto de *Sphaeranthus indicus*” o el compuesto 1, en combinación con al menos una sustancia bioactiva para obtener un efecto sinérgico.

10 **[0076]** En otra realización adicional, la composición de la presente invención que comprende el ingrediente activo, “extracto de *Sphaeranthus indicus*” o el compuesto 1, puede contener opcionalmente al menos cualquier otro agente antiinflamatorio o también puede usarse en combinación con un agente antiinflamatorio convencional. El agente antiinflamatorio puede seleccionarse de esteroides tales como prednisolona, hidrocortisona; fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (FAME), tales como metotrexato, sulfasalazina; o AINE, tales como naproxeno, diclofenaco, ibuprofeno y similares.

15 **[0077]** En una realización, se proporciona la composición herbácea que comprende el ingrediente activo, “extracto de *Sphaeranthus indicus*” o el compuesto 1 aislado del extracto de *Sphaeranthus indicus*, para el tratamiento de artritis reumatoide.

20 **[0078]** Otra realización de la presente divulgación también se refiere a la actividad inhibidora del TNF- α e interleucina (IL-1, IL-6, IL-8) de las composiciones que comprenden el ingrediente activo.

25 **[0079]** Otra realización también se refiere a la inhibición de la expresión de la superficie celular de moléculas de adhesión tales como la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1), molécula 1 de adhesión vascular-celular (VCAM-1) y E-Selectina por las composiciones que comprenden el ingrediente activo.

30 **[0080]** Las composiciones de la presente divulgación son adecuadas para su uso en el tratamiento de formas tanto agudas como crónicas de trastornos inflamatorios mediados por TNF- α , interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8) e ICAM-1, VCAM-1 y E-Selectina, en particular, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis psoriásica, osteoartritis, artritis reumatoide refractaria, artritis no reumatoide crónica, osteoporosis/reabsorción ósea, cardiopatía coronaria, vasculitis, colitis ulcerosa, psoriasis, síndrome de distrés respiratorio del adulto, enfermedad Alzheimer en seres humanos. Además, las composiciones de la presente invención pueden usarse para el tratamiento de inflamación en enfermedades como enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, síndrome de choque séptico, aterosclerosis y diversas enfermedades autoinmunitarias entre otras afecciones clínicas. La presente divulgación también se refiere a un método de tratamiento de trastornos inflamatorios que comprende la administración de las composiciones selectivamente por vía oral, por aplicación tópica, por aplicación transdérmica.

40 **[0081]** Los siguientes ejemplos ilustran, pero no limitan, el ámbito de la invención. Los expertos habituales en la técnica han de entender que el presente análisis es solo de realizaciones ejemplares, y no pretenden limitar los aspectos más amplios de la presente invención, los cuales se realizan en la construcción ejemplar.

Ejemplo 1

Preparación de extracto de metanol de *Sphaeranthus indicus*.

45 **[0082]** Se pulverizaron capítulos florales y fructíferos de *Sphaeranthus indicus* secos (200 g). El material pulverizado se extrajo usando metanol (2,5 l) agitando a 60 °C durante 3 horas. El extracto se filtró al vacío. Este proceso de extracción se repitió dos veces más. Los extractos se combinaron y se concentraron.

50 **[0083]** Rendimiento: 23,29 g (11,65% p/p).

[0084] Se encontró que el extracto del ejemplo 1 contenía un 6% del compuesto 1 (como se describe en el ejemplo 4), calculado mediante HPTLC.

55 Ejemplo 2

Preparación de extracto de etilacetato de *Sphaeranthus indicus*.

60 **[0085]** Se pulverizaron capítulos florales y fructíferos de *Sphaeranthus indicus* (350 g). El material pulverizado se extrajo usando etilacetato (3 l) agitando a 60 °C durante 3 horas. El extracto se filtró al vacío. Este proceso de extracción se repitió dos veces más. Los extractos se combinaron y se concentraron.

[0086] Rendimiento: 19 g (9,5% p/p).

65 Ejemplo 3

Preparación de extracto acuoso de *Sphaeranthus indicus*.

5 [0087] Se pulverizaron capítulos florales y fructíferos de *Sphaeranthus indicus* secos (200 g). El material pulverizado se extrajo usando agua (1,2 l) agitando a 80 °C-90 °C durante 3 horas. El extracto se filtró al vacío. Este proceso de extracción se repitió. Los extractos se combinaron y se concentraron para eliminar el agua. Adicionalmente, el extracto bruto se secó por criodeseccación.

[0088] Rendimiento: 21 g (10,5% p/p).

10 Ejemplo 4

Aislamiento de 3a-hidroxi-5a,9-dimetil-3-metilen-3a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahidro-3H-nafto[1,2-b]furan-2-ona (compuesto 1).

15 [0089] El extracto de metanol (32 g), preparado mediante el método descrito en el ejemplo 1, se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, metanol en cloroformo). La purificación final se consiguió mediante HPLC preparativa (columna de sílice, hexano:isopropanol, 95:5) para obtener el compuesto indicado. 1 H RMN (CDCl₃, 500 MHz): δ1.085 (3H, CH₃), 4.997 (1 H, s), 5.801 (1 H, s), 6.270 (1 H, s); MS: m/e (ES) 248 (M+).

20 [0090] El compuesto se caracterizó comparando los datos espectrales obtenidos con la bibliografía publicada (Indian Journal of Chemistry, Vol. 25B, 233-238, (1986); J. Chem Soc. Perkin Trans. 1: (2), 157-160, (1988); J. Chem. Research (M), 0501-0509, 1989).

Resultados farmacológicos

25 [0091] La eficacia de los extractos vegetales de la presente invención, compuestos aislados por purificación del extracto y formulaciones, en cuanto a la inhibición de la actividad del TNF-α e interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8) se determinó mediante diversos ensayos farmacológicos, bien conocidos en la técnica y descritos a continuación.

30 Exploración *in vitro* para identificar inhibidores de TNF-α

Ejemplo 5

35 [0092] Exploración primaria - células mononucleares de sangre periférica humana (CMSPH). La producción de TNF-α por lipopolisacáridos (LPS) en las CMSPH se midió de acuerdo con el método descrito por Jansky, L. et al (Physiol. Res. 52: 593-598, (2003)). Se extrajo sangre de donantes sanos en tubos vacutainer (BD vacutainer) con EDTA Potásico. Las CMSP se aislaron usando centrifugación en gradiente en solución Histopaque-1077 (Sigma). Las CMSP aisladas se suspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco BRL, Pasley, RU) que contenía suero bovino fetal (SBF) al 10% (Hyclone, Utah, Estados Unidos), 100 U/ml de penicilina (Sigma Chemical Co. St Louis, MO) y 100 µg/ml de estreptomycin (Sigma Chemical Co. St Louis, MO). La concentración celular se ajustó a 1x10⁶ células/ml. La viabilidad, determinada por exclusión con colorante azul de tripano, fue uniformemente ≥98%. A los pocillos de una placa de cultivo de 96 pocillos se añadió la suspensión celular (100 µl). Después de sembrar en placa las células, 79 µl del medio de cultivo y 1 µl de ocho concentraciones diferentes de las muestras de ensayo (concentración final 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 µg/ml) disuelto en DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma, MO, Estados Unidos) se añadieron a las células. La concentración final de DMSO se ajustó al 0,5%. Como control se usó el vehículo (DMSO al 0,5%). Como patrón se usó rolipram (100, 300 µM). Las placas se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Finalmente, se añadieron 20 µl (10 µg/ml) por pocillo de LPS, (*Escherchia coli* 0127:B8, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), para una concentración final de 1 µg/ml. Las placas se incubaron a 37 °C durante 5 horas en una atmósfera de CO₂ al 5%. Para evaluar el efecto de citotoxicidad de los extractos vegetales, se realizó ensayo de viabilidad celular usando reactivo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio) después de 5 h de incubación. Los sobrenadantes se recuperaron y se sometieron a ensayo para TNF-α por ELISA como describe el fabricante (OptiEIA ELISA sets, BD Biosciences, Pharmingen). Se registró el % de inhibición. Se evaluó el porcentaje de citotoxicidad de las muestras de ensayo comparadas con el control.

55 [0093] En la tabla 1 se resumen los resultados.

Tabla 1: inhibición de TNF-α en células mononucleares de sangre periférica humana

| Muestra | Concentración (µg/ml) | % Inhibición de TNF | % de Toxicidad a las 5h |
|------------------------|-----------------------|---------------------|-------------------------|
| Extracto del ejemplo 1 | 0,1 | 0,0 | 0 |
| | 1 | 14,0 | 0 |
| | 10 | 96,0 | 7 |

| Muestra | Concentración (µg/ml) | % Inhibición de TNF | % de Toxicidad a las 5h |
|------------------------|-----------------------|---------------------|-------------------------|
| | 100 | 97,0 | 0 |
| Extracto del ejemplo 2 | 0,1 | 0,0 | 20 |
| | 1 | 34,0 | 13 |
| | 10 | 97,0 | 22 |
| | 100 | 97,0 | 8 |
| Extracto del ejemplo 3 | 0,1 | 0,0 | 0 |
| | 1 | 0,0 | 11 |
| | 10 | 4,0 | 0 |
| | 100 | 96,0 | 0 |
| Rolipram (µM) | 100 | 84,0 | 2 |
| | 300 | 90,0 | 21 |

Ejemplo 6

Ejemplo sobre citocinas proinflamatorias liberadas por CMSPH estimuladas con LPS

5

[0094] Efecto del extracto vegetal sobre las citocinas proinflamatorias: el TNF- α , la interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) se midieron usando los sobrenadantes generados en el ensayo de exploración primaria. Los niveles de estas citocinas se calcularon por ELISA como describe el fabricante. (OptiEIA ELISA sets, BD Biosciences, Pharmaginen). Los valores de concentración inhibidora al 50% (CI₅₀) se calcularon mediante un método de regresión no lineal usando el programa informático GraphPad (Prism 3.03).

10

Tabla 2: efecto del extracto del ejemplo 1, sobre las citocinas proinflamatorias

| Sr. Nº | Citocinas proinflamatorias | Extracto del ejemplo 1, CI ₅₀ µg/ml, (CMSPH) |
|--------|----------------------------|---|
| 01 | TNF- α | 5,1 |
| 02 | IL 1 β | 4,9 |
| 03 | IL-6 | 26,8 |
| 04 | IL-8 | 31,0 |

[0095] Conclusión: se encontró que el extracto del ejemplo 1 inhibía a las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) liberadas por las CMSPH estimuladas por LPS.

15

Ejemplo 7

Efecto del compuesto 1 sobre citocinas proinflamatorias liberadas por las CMSPH estimuladas por LPS

20

[0096] El compuesto 1 se obtuvo usando el procedimiento del ejemplo 4. La evaluación de bioactividad se realizó según el procedimiento del ejemplo 6.

[0097] El efecto del Compuesto 1 sobre las citocinas proinflamatorias: TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) se midió usando los sobrenadantes generados en el ensayo de exploración primaria. Los niveles de estas citocinas se calcularon por ELISA como describe el fabricante. (OptiEIA ELISA sets, BD Biosciences, Pharmaginen). Los valores de concentración inhibidora al 50% (CI₅₀) se calcularon mediante un método de regresión no lineal usando el programa informático GraphPad (Prism 3.03). En la tabla 3 se resumen los resultados

25

30

Tabla 3: efecto del compuesto 1 sobre las citocinas proinflamatorias

| Sr. Nº | Citocinas proinflamatorias | Compuesto 1, CI ₅₀ µM (CMSPH) |
|--------|----------------------------|--|
| 01 | TNF- α | 0,7 |
| 02 | IL 1 β | 0,4 |
| 03 | IL-6 | 1,6 |
| 04 | IL-8 | 8,9 |

[0098] Conclusión: se encontró que el compuesto 1 inhibía a las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) liberadas por las CMSPh estimuladas por LPS.

5 **Ejemplo 8**

Efecto sobre citocinas proinflamatorias producidas por células sinoviales obtenidas de un paciente con AR.

10 **[0099]** La producción de citocinas por células sinoviales obtenidas de un paciente con artritis reumatoide (AR) sometido a artroplastia de rodilla se midió de acuerdo con el método descrito por Brennan, F. M. et al (The Lancet. 29 de julio: 244-247, (1989)). El tejido de la membrana sinovial se sometió a digestión en DMEM (Gibco) que contenía SBF al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin, 4 mg/ml de colagenasa de tipo I (Worthington), 1,5 μ g/ml de Dnasa de tipo I (Sigma) y 15 U/ml de heparina y se incubó a 37 °C durante 3 horas. Después de la incubación, el tejido digerido se filtró a través de una membrana de 70 μ m y las células se lavaron 3 veces en medio completo (DMEM con SBF al 10%). Las células sinoviales se cultivaron a 1×10^6 células/ml en presencia/ausencia de la muestra de ensayo durante 10 horas. Los sobrenadantes se recogieron por centrifugación y los niveles de las citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) se midieron por ELISA. Para evaluar el efecto citotóxico de los extractos vegetales, se realizó un ensayo de viabilidad celular usando reactivo MTS. Se calcularon los valores de concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀) mediante un método de regresión no lineal usando el programa informático GraphPad (Prism 3.03).

[0100] Conclusión: se encontró que el extracto del ejemplo 1 inhibía a las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) producidas por células sinoviales obtenidas de un paciente con AR.

25 **Ejemplo 9**

[0101] Efecto del compuesto 1 sobre citocinas proinflamatorias producidas por células sinoviales obtenidas de un paciente con AR.

30 **[0102]** Se estudió el efecto sobre citocinas proinflamatorias producidas por células sinoviales obtenidas de un paciente con AR para el compuesto 1 como se ha descrito mediante el procedimiento del ejemplo 8.

[0103] En la tabla 4 se resumen los resultados.

35 Tabla 4: efecto del compuesto 1 sobre citocinas proinflamatorias producidas por células sinoviales

| Sr. Nº | Citocinas proinflamatorias | Compuesto 1, IC ₅₀ (μ M), células sinoviales |
|--------|----------------------------|--|
| 01 | TNF- α | 0,8 |
| 03 | IL-6 | 1,4 |
| 04 | IL-8 | 10,9 |

[0104] Conclusión: se encontró que el compuesto 1 inhibía a las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-8) producidas por células sinoviales obtenidas de un paciente con AR.

40 **Ejemplo 10**

ELISA celular para la expresión de moléculas de adhesión

45 **[0105]** El ensayo se diseñó basándose en la referencia Transplantation, Vol 63(5), 759-764, 1997 con modificaciones.

Cultivo Celular y Reactivos

50 **[0106]** Se obtuvieron Células Endoteliales Humanas de Vena Umbilical (CEHVU) en Cascade Biologies y se conservaron en M200 (Cascade Biologies, Portland, Or) complementado con complemento de crecimiento con bajo contenido en suero (CCBS) a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 5%. Se cultivaron células U937 (ATCC, Manassas, VA) en el medio RPMI 1640 complementado con SBF al 10% (Hyclone, Logan, UT). El TNF α humano recombinante, los anticuerpos contra VCAM-1, ICAM-1, E-Selectina se obtuvieron en R&D Systems y el LPS se obtuvo en Sigma (St. Louis, MO).

55 ELISA celular para la expresión de moléculas de adhesión

[0107] Las CEHVU se sembraron en placas a 7×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos revestidas con fibronectina. Las células se estimularon con TNF- α (10 μ g/ml) o LPS (1 μ g/ml), 30 min después de la adición del

compuesto de ensayo. Después de la estimulación, las células (E-Selectina e ICAM-1) se fijaron con paraformaldehído en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La unión no específica se bloqueó con albúmina de suero bovino (ASB) al 2% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1 h, y las células se incubaron con anticuerpo primario durante 2 h. Para la detección de VCAM-1 las células se bloquearon, se incubaron con anticuerpo primario durante una noche y después se fijaron. Las células se lavaron con ASB al 0,1% en PBS, e incubadas con anticuerpo (Ab) contra inmunoglobulina G (IgG) de ratón conjugado con peroxidasa se añadieron durante 90 min. Después del lavado, siete veces, se añadió sustrato líquido de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (sustrato TMB) y se determinó la densidad óptica de cada pocillo a 450 nm usando un lector de placa de microtitulación (Spectramax, Molecular Devices, CA). Como patrón se usó BAY 11-7082 [(E)-3-(4-metilfenilsulfonil)-2-propenonitrilo] y DMSO como control vehículo. Se evaluó el porcentaje de inhibición de la muestra de ensayo en comparación con el control. Los valores de concentración inhibidora al 50% (CI₅₀) de cada muestra comparados con el control se determinaron mediante un método de regresión no lineal. En la tabla 5 se resumen los resultados.

Tabla 5: ELISA celular para expresión de moléculas de adhesión para el extracto del ejemplo 1 y el compuesto 1

| | Extracto del ejemplo 1 CI ₅₀ (µg/ml) | Compuesto 1, CI ₅₀ (µM) |
|-------------|---|------------------------------------|
| ICAM-1 | 7,6 | 0,52 |
| VCAM-1 | 6,4 | 0,4 |
| E-Selectina | 3,5 | 0,2 |

Conclusión:

[0108] El extracto del ejemplo 1 y el compuesto 1 redujeron, de un modo dependiente de la dosis, la expresión superficial inducida por TNF-α de moléculas de adhesión celular endotelial tales como ICAM-1, VCAM-1 y E-Selectina.

Ejemplo 11

Adhesión de células mononucleares THP-1 a monocapas de CEHVU

[0109] Se realizaron estudios de adhesión con la línea celular promonocítica THP-1, que se había establecido como modelo útil para monocitos en estudios de adhesión en Circ. Res., 97, 236-243, 2005, con modificaciones. Las células THP-1 se lavaron dos veces con medio marcador (M200 más LSGS). Las células THP-1 (6x10⁵ células por ml) se marcaron con acetoximetil éster de biscarboxietil-carboxifluoresceína 10 µg/ml (una sonda fluorescente, BCECF-AM; Sigma) durante 30 min a TA. Después de inactivar con BSA al 0,1%, el sedimento se resuspendió en medio marcador. Para evaluar la adhesión de monocitos, monocapas de CEHVU se trataron con TNF-α (1 ng/ml) en presencia o en ausencia de diversas concentraciones de muestras de ensayo. Los medios se eliminaron, se lavaron y a los pocillos se añadieron células THP-1 marcadas (6x10⁴ células por pocillo) y se incubaron durante 10 minutos a TA en la oscuridad. Después de la co-incubación, los pocillos se lavaron, se cargaron con tampón de lisis (Triton-X al 0,1 % en tampón Tris 1,5M) y se incubaron durante 30 min. La fluorescencia se midió usando un lector de fluorescencia (PolarStar Optima, BMG Labtech) a una excitación máxima de 485 nm y a una emisión máxima de 520 nm. Los valores son medias + ETM, que representan datos de adhesión de fluorescencia.

[0110] Como patrón se usó BAY 11-7082 [(E)-3-(4-metilfenilsulfonil)-2-propenonitrilo] y DMSO como control vehículo. En la tabla 6 se resumen los resultados.

Tabla 6: adhesión de células mononucleares THP-1 a monocapas de CEHVU para el extracto del ejemplo 1 y compuesto 1

| Sr. N° | Muestra de ensayo | Concentración | Intensidad de fluorescencia | Veces de control |
|--------|------------------------|---------------|-----------------------------|------------------|
| 01 | Extracto del ejemplo 1 | 1 (µg/ml) | 39768 | 23 |
| | | 3 (µg/ml) | 35302 | 21 |
| | | 10 (µg/ml) | 13183 | 6 |
| | | 30 (µg/ml) | 10236 | 5 |
| 02 | Compuesto 1 | 0.1 (µM) | 33421 | 13 |
| | | 0.3 (µM) | 34024 | 13 |
| | | 1 (µM) | 10195 | 4 |
| | | 3 (µM) | 5728 | 2 |

| Sr. N° | Muestra de ensayo | Concentración | Intensidad de fluorescencia | Veces de control |
|--------|--------------------------------|---------------|-----------------------------|------------------|
| 03 | BAY 11-7082 | 0.5 (µM) | 18442 | 10 |
| | | 1 (µM) | 14271 | 8 |
| 04 | Control no estimulado con DMSO | | 2544 | 1 |
| | Control estimulado con DMSO | | 30791 | 18 |

[0111] Conclusión: el extracto del ejemplo 1 y el compuesto 1 inhibieron la adhesión de células THP-1 monocíticas estimuladas con TNF-α a CEHVU a 10 µg/ml y 1 µM respectivamente.

[0112] Por lo tanto, dado que estos compuestos inhiben la expresión superficial celular de las moléculas de adhesión en CEHVU así como la adhesión de monocitos a las CEHVU, pueden detener la migración de leucocitos, que es un acontecimiento clave en enfermedades inflamatorias crónicas y pueden demostrar ser beneficiosas en diversos trastornos inflamatorios.

Estudios *In vivo*

Ejemplo 12

[0113] Liberación del factor de necrosis tumoral (TNF)-α inducido por lipopolisacárido (LPS) en ratones BALB/c.

[0114] Se siguió el protocolo descrito por Fukuda T. et al (Eur. J. Pharmacol., 391: 317-320, (2000)). Ratones BALB/c se dividieron en grupos de diez cada uno. La muestra de ensayo, suspendida en Tween 80 y en carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5%, se administró por vía oral (p.o.) a los ratones. Una hora después, se administró LPS disuelto en solución salina apirógena estéril por vía i.p. a la dosis de 1 mg/kg. El grupo de control negativo recibió solución salina como una inyección i.p., mientras que los otros grupos recibieron LPS. Como fármaco patrón se usó Rolipram (30 mg/kg, p.o.). Una hora y media después, bajo anestesia con uretano (1,5 g/kg, i.p.), se extrajo sangre de la arteria abdominal usando una jeringa de 1 ml enjuagada con heparina (500 UI/ml). La heparina (5 µl) se usó como un anticoagulante en los tubos de extracción de sangre. Se separó el plasma por centrifugación a 10000 rpm a temperatura ambiente, se dividió en alícuotas y se conservó a -70 °C hasta el análisis. Los niveles de TNF-α en las muestras de sangre se sometieron a ensayo usando ELISA y se calculó el porcentaje de inhibición de la liberación de TNF-α en comparación con el grupo de control. En la tabla 7 se resumen los resultados.

Tabla 7: liberación del factor de necrosis tumoral (TNF)-α inducido por lipopolisacárido (LPS) en ratones BALB/c para el extracto del ejemplo 1 y para el compuesto 1

| Sr. N°. | Muestra de ensayo | Dosis mg/kg | % de inhibición |
|---------|------------------------|-------------|-----------------|
| 01 | Extracto del ejemplo 1 | 100 | 43,21 ± 14,52 |
| 02 | Compuesto 1 | 10 | 28,69 ± 13,71 |
| | | 30 | 39,98 ± 10,32 |
| | | 100 | 87,10 ± 3,67 |

[0115] Conclusión: el extracto del ejemplo 1 y el compuesto 1, inhiben la liberación de TNF-α en ratones BALB/c.

Ejemplo 13

Artritis inducida por colágeno (AIC) en ratones DBA/1J

Ratones macho DBA/1J, de 8-10 semanas de vida, se inmunizaron con 200 µg de Colágeno

[0116] Tipo II como una emulsión en Adyuvante Completo de Freund, por inyección intradérmica en la base de la cola. Veintiún días después, se administró a los ratones una inyección de refuerzo de Colágeno de Tipo II 100 µg. Junto a estos ratones también se mantuvo un conjunto de ratones sin tratar.

[0117] Desde el día 23 hacia adelante, se evaluó en los ratones la aparición de artritis reumatoide usando, como un parámetro, el Índice Articular. En el estudio se indujeron ratones con una puntuación mínima de 2 en las patas traseras. El extracto del ejemplo 1 se administró a una dosis de 400 m.p.k (miligramo por kilogramo de peso corporal) por vía oral dos veces al día durante 12 días. El compuesto 1 se administró a una dosis de 50 m.p.k. y 100 m.p.k. por vía oral dos veces al día durante 12 días. Se usó Enbrel (3 mg/kg) como un patrón y se proporcionó por

vía subcutánea una vez al día. El volumen y el índice articular de las patas se registró diariamente. Se analizó el significado estadístico de los datos.

[0118] Al final del experimento las patas de los ratones se procesaron para evaluación histopatológica.

[0119] En la tabla 8 se resumen los datos de reducción del grosor de las patas y reducción del índice articular de las patas.

Tabla 8: eficacia del extracto del ejemplo 1 y compuesto 1 en el modelo de AIC

| Muestra de ensayo | Parámetros | | |
|------------------------|-------------|--|--|
| | AIC | | |
| | Dosis mg/kg | Reducción del grosor de las patas | Reducción del índice articular |
| Extracto del ejemplo 1 | 400 | Estadísticamente significativa sobre el control a un nivel de significación del 0,01 | Estadísticamente significativa sobre el control entre el nivel de significación del 0,05 y 0,06. |
| Compuesto 1 | 50 | Estadísticamente significativa sobre el control a un nivel de significación del 0,05 | Estadísticamente significativa sobre el control a un nivel de significación del 0,05 |
| | 100 | Estadísticamente significativa sobre el control a un nivel de significación del 0,01 | Estadísticamente significativa sobre el control a un nivel de significación del 0,01 |

Análisis histopatológico:

[0120] Se evaluó el efecto beneficioso del extracto del ejemplo 1 y compuesto 1 sobre la patología de ratones artríticos DBA/1J (AIC). Se realizó microscopía después de tinción con Hematoxilina y Eosina así como tinción con Safranina O de las articulaciones sinoviales. El análisis histopatológico mostró que, tanto el extracto del ejemplo 1 como el compuesto 1, ejercían efectos beneficiosos en cuanto a la reducción de la destrucción de cartílago, destrucción ósea y sinovitis en comparación con el grupo tratado con vehículo.

[0121] Conclusión: tanto el extracto del ejemplo 1 como el compuesto 1 ejercieron efectos beneficiosos en el modelo de artritis AIC.

Estudios de toxicidad

Ejemplo 14

Toxicidad oral aguda

[0122] El extracto del ejemplo 1 se sometió a ensayo con respecto a la toxicidad oral aguda en ratas Sprague Dawley de acuerdo con las directrices determinadas en el "Esquema Y" de Drugs and Cosmetics Act, 1940. (India)

[0123] El extracto del ejemplo 1, suspendido en Tween 80 al 0,5% en agua, se administró por vía oral mediante sonda como una sola dosis a un grupo de cinco ratas macho y cinco ratas hembra a una dosis máxima practicable de 2000 mg/kg de peso corporal. Los animales se observaron con respecto a mortalidad y síntomas de intoxicación durante un periodo de 14 días después de la dosificación y también se registraron sus pesos corporales. Al final del estudio se realizó la necropsia de todas las ratas.

[0124] Conclusión: en este estudio, la administración oral sencilla de extracto del ejemplo 1 a ratas Sprague Dawley a la dosis máxima practicable de 2000 mg/kg no produjo ninguna mortalidad en las ratas tratadas.

[0125] Se encontró que la dosis letal media (DL₅₀) del extracto del ejemplo 1, después de administración oral como una sola dosis en ratas Sprague Dawley, tanto en hembras como en machos, era mayor de 2000 mg/kg de peso corporal.

Ejemplo 15

Toxicidad oral subcutánea

[0126] Se realizó un estudio de toxicidad oral subcutánea (día 28) del extracto del ejemplo 1 en ratas Sprague Dawley de acuerdo con las directrices establecidas en el "Esquema Y" de Drugs and Cosmetics Act, 1940. (India)

[0127] A grupos de ratas Sprague Dawley de seis machos y seis hembras se les administraron dosis diarias de 0, 250, 500 o 1000 mg/kg de peso corporal de extracto de ejemplo 1 mediante sonda oral durante 28 días y se sacrificaron el día 29 para evaluar su toxicidad. Las ratas se examinaron diariamente con respecto a síntomas de toxicidad. Se registró el peso corporal y el consumo de alimento en ratas individuales durante el periodo experimental junto con todas las frecuencias de mortalidad y síntomas de enfermedad. Al final del estudio se realizaron análisis clínicos de sangre.

[0128] Cuando finalmente todos los animales se sacrificaron, se sometieron a una necropsia completa y se registraron los pesos de algunos órganos. La evaluación histopatológica se realizó en todos los tejidos enumerados en el protocolo en todos los animales de los grupos de control y de alta dosificación.

[0129] Todos los animales que recibieron extracto del ejemplo 1 y hasta la dosis de 1000 mg/kg sobrevivieron durante el periodo de tratamiento. No se observaron síntomas clínicos de toxicidad en ninguno de los animales tratados. Los datos sobre el aumento de peso corporal y consumo de alimento indicaron que no había efectos adversos debido al artículo del ensayo y hasta la dosis de 1000 mg/kg.

[0130] Conclusión: basándose en los descubrimientos de este estudio, se encontró que el nivel de efectos adversos no observables (NOAEL) del extracto del ejemplo 1 en ratas, después de administración oral durante 28 días, era mayor de 1000 mg/kg de peso corporal.

Formulaciones

Ejemplo 16

Preparación de cápsulas

[0131] Procedimiento general: los ingredientes 01 a 05 en una cantidad especificada se pesaron y se transfirieron a una mezcladora adecuada. Los contenidos se mezclaron bien y se añadieron los ingredientes 09, 10 y 11 y prosiguió la mezcla. A esta combinación se añadieron los ingredientes 06, 07 y 08 y la masa se mezcló durante 30-40 minutos. La combinación se hizo pasar a través de un tamiz de malla 40, y se usó para rellenar cápsulas.

Tabla 9: formulación en cápsulas de *Sphaeranthus indicus*

| Cada cápsula contiene | | |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------|
| SR. N° | INGREDIENTE | CANTIDAD % en P/P |
| 01 | Extracto del ejemplo 1 | 69,72 |
| 02 | Metil parabeno sódico | 0,39 |
| 03 | Propil parabeno sódico | 0,13 |
| 04 | Bromerol | 0,18 |
| 05 | Benzoato sódico | 0,39 |
| 06 | Talco | 2,61 |
| 07 | Estearato de magnesio | 1,74 |
| 08 | Aerosil | 0,87 |
| 09 | Glicolato sódico de almidón | 2,18 |
| 10 | Lactosa | 8,72 |
| 11 | Fosfato cálcico dibásico | 13,07 |

Ejemplo 17

Preparación de comprimidos

[0132] Procedimiento general: los ingredientes 01 a 05 en una cantidad especificada se pesaron y se transfirieron a una mezcladora adecuada. El ingrediente 13 se añadió y la masa húmeda se mezcló bien. A esta, se añadieron los ingredientes 09, 10, 11 y 12 y la mezcla continuó hasta que se obtuvo una masa homogeneizada. Esta masa húmeda se hizo pasar a través de un tamiz de malla 16 y los gránulos húmedos se secaron a 70 °C ± 5 °C. A los gránulos anteriores se añadieron los ingredientes 06, 07 y 08 y la masa se mezcló durante 30-45 minutos. La combinación se hizo pasar a través de un tamiz de malla 40 y los comprimidos se comprimieron usando un troquel adecuado.

Tabla 10: formulación de comprimidos de *Sphaeranthus indicus*

| Cada comprimido contiene | | |
|--------------------------|-----------------------------|-------------------|
| SR. Nº | INGREDIENTE | CANTIDAD % en P/P |
| 01 | Extracto del ejemplo 1 | 66,53 |
| 02 | Metil parabeno sódico | 0,37 |
| 03 | Propil parabeno sódico | 0,12 |
| 04 | Bromerol | 0,17 |
| 05 | Benzoato sódico | 0,37 |
| 06 | Talco | 2,50 |
| 07 | Estearato de magnesio | 1,66 |
| 08 | Aerosil | 0,83 |
| 09 | Glicolato sódico de almidón | 2,50 |
| 10 | Lactosa | 8,32 |
| 11 | Fosfato cálcico dibásico | 12,47 |
| 12 | Almidón | 4,16 |
| 13 | Isopropanol | * |
| * solo para granulación | | |

Ejemplo 18

5 Preparación de jarabe

Procedimiento general

10 **[0133]** El ingrediente 01 se pesó y se le añadió el ingrediente 15 con agitación continua. A esto se añadieron cantidades medidas en peso de los ingredientes 03, 04, 05, 06, 08, 09, 10, 11, 12 y 14 con agitación continua para disolver. Los ingredientes 02 y 13 se pesaron y se disolvieron en el ingrediente 07. A esto se añadió agua purificada para ajustar el volumen a 10 ml. La solución obtenida se filtró a través de una prensa de filtro/tela de nylon.

Tabla 11: formulación de jarabe de *Sphaeranthus indicus*

| Cada 10 ml de jarabe contienen | | |
|--------------------------------|-----------------------------|------------------|
| SR. Nº | INGREDIENTE | CANTIDAD %en P/P |
| 01 | Extracto del ejemplo 1 | 4 |
| 02 | Polvo de menta piperita | 0,025 |
| 03 | Miel | 0,25 |
| 04 | Azúcar | 50 |
| 05 | Solución de sorbitol al 70% | 5 |
| 06 | Glucosa líquida | 10 |
| 07 | Propilenglicol | 5 |
| 08 | Ácido cítrico monohidrato | 0,5 |
| 09 | Metil parabeno sódico | 0,2 |
| 10 | Propil parabeno sódico | 0,02 |
| 11 | Benzoato sódico | 0,2 |
| 12 | Bronopol | 0,02 |
| 13 | Esencia de menta fresca "S" | 0,25 |

| Cada 10 ml de jarabe contienen | | |
|--------------------------------|---------------------------------|------------------|
| SR. Nº | INGREDIENTE | CANTIDAD %en P/P |
| 14 | Colorante de caramelo azucarado | 0,75 |
| 15 | Agua purificada | c.s hasta 10 ml |

Ejemplo 19

Preparación de formulación en crema

5

Procedimiento general

10

[0134] El ingrediente 01 se pesó y se suspendió en el ingrediente 17. Los ingredientes 02 a 07 se combinaron. Los ingredientes 08, 09, 10, 11, 13 y 14 se pesaron y se mezclaron con la parte del 18. El ingrediente 12 se pesó y se añadió a la parte restante del ingrediente 18 y se mezcló con los ingredientes 15 y 16. El contenido de todas las fases se mezcló a 55 °C y se homogeneizó, se dejó enfriar y se envasó en un tubo adecuado.

Tabla 12: formulación en crema de *Sphaeranthus indicus*

| Cada 100 g de crema contiene | | |
|------------------------------|-------------------------------|------------------|
| SR. Nº | INGREDIENTE | CANTIDAD %en P/P |
| 01 | Extracto del ejemplo 1 | 05,00 |
| 02 | Alcohol cetosteárico - 12,0 g | 12,00 |
| 03 | Cetomacragol - 1000 | 03,00 |
| 04 | Monooleato de sorbitán | 02,00 |
| 05 | Glicerol monoestearato S.E. | 03,00 |
| 06 | Isopropil miristato | 02,50 |
| 07 | Ácido esteárico | 02,50 |
| 08 | Metil parabeno sódico | 00,40 |
| 09 | Propil parabeno sódico | 00,08 |
| 10 | Fenoxietanol | 00,52 |
| 11 | EDTA disódica | 00,02 |
| 12 | Carbomer - 940 | 00,75 |
| 13 | Lauril sulfato sódico | 00,75 |
| 14 | Simeticona | 01,00 |
| 15 | Trietanolamina | 01,00 |
| 16 | Propilenglicol | 05,00 |
| 17 | Isopropanol | 10,00 |
| 18 | Agua | 50,48 |

15 **Ejemplo 20**

Preparación de formulación en gel

Procedimiento general

20

[0135] El ingrediente 01 se pesó y se suspendió en el ingrediente 06. El ingrediente 04 se disolvió en el ingrediente 07. Los ingredientes 05 y 08 se mezclaron. Los ingredientes 02 y 03 se mezclaron. La combinación se mezcló bien y se envasó en un tubo adecuado.

Tabla 13: formulación en gel de *Sphaeranthus indicus*

| Cada 100 g de gel contiene | | |
|----------------------------|-------------------------|-------------------|
| SR. Nº | INGREDIENTE | CANTIDAD % en P/P |
| 01 | Extracto del ejemplo 1 | 05,00 |
| 02 | Hidroxitolueno butilado | 00,025 |
| 03 | Hidroxianisol butilado | 00,025 |
| 04 | Carbopol - 940 | 02,95 |
| 05 | Polietilenglicol - 400 | 30,00 |
| 06 | Isopropanol | 05,00 |
| 07 | Propilenglicol | 55,00 |
| 08 | Monooleato de sorbitán | 02,00 |

Ejemplo 21

5 Preparación de formulación en pomada

Procedimiento general

- 10 **[0136]** Los ingredientes 02 a 06 se pesaron y se combinaron en un recipiente adecuado. A esto, se añadió el ingrediente 01. A esta combinación se añadieron los ingredientes 07 y 08. Los contenidos se mezclaron bien y se envasaron en un tubo adecuado.

Tabla 14: formulación en pomada de *Sphaeranthus indicus*

| Cada 100 g de pomada contiene | | |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------|
| SR. Nº | INGREDIENTE | CANTIDAD % en P/P |
| 01 | Extracto del ejemplo 1 | 05,00 |
| 02 | Cera blanca de abeja | 15,00 |
| 03 | Parafina dura | 25,00 |
| 04 | Cera microcristalina | 15,00 |
| 05 | Parafina blanca blanda | 30,00 |
| 06 | Parafina líquida ligera | 09,95 |
| 07 | Hidroxitolueno butilado | 0,025 |
| 08 | Hidroxianisol butilado | 0,025 |

15 **Ejemplo 22**

Preparación de comprimidos

Procedimiento general

- 20 **[0137]** Los ingredientes 01 y 02 se pesaron por separado, se tamizaron a través de una malla 20 y se mezclaron. Los ingredientes 03 a 07 se pesaron y se tamizaron a través de una malla 40. Los ingredientes 03, 04, 05 y 07 se mezclaron y a esta mezcla de ingredientes se añadieron los ingredientes 01 y 02. A esta combinación se añadió el ingrediente 06 y se mezcló. La combinación lubricada obtenida se comprimó con una herramienta mecánica adecuada.
- 25

Tabla 15: formulación en comprimidos del compuesto 1

| Cada comprimido contiene | | |
|--------------------------|----------------------------------|-------------------|
| SR. Nº | INGREDIENTE | CANTIDAD % en P/P |
| 01 | Compuesto 1 | 58,33 |
| 02 | Celulosa microcristalina | 35,97 |
| 03 | Talco | 2,50 |
| 04 | Glicolato sódico de almidón | 1,60 |
| 05 | Dióxido de silicio coloidal | 0,80 |
| 06 | Estearato de magnesio | 0,50 |
| 07 | Colorante amarillo de quinoleína | 0,30 |

Ejemplo 23

5 Preparación de comprimidos

Procedimiento general

10 **[0138]** Los ingredientes 01 y 02 se pesaron por separado y se tamizaron a través de una malla 20. El ingrediente 04 se disolvió en el ingrediente 08 agitando. La combinación anterior se granuló usando solución aglutinante. La masa húmeda se hizo pasar a través de un tamiz adecuado. La masa tamizada se secó a temperatura ambiente (25 °C) y después a aproximadamente 40 °C. La masa seca se tamizó a través de un tamiz adecuado. Los ingredientes 03, 05 y 07 se tamizaron por separado a través de una malla 40 y se mezclaron. A esto se le añadió la masa seca y se mezcló. A esta combinación se añadió el ingrediente 06 y la combinación lubricada se comprimió con una
15 herramienta mecánica adecuada.

Tabla 16: formulación en comprimidos del compuesto 1

| Cada comprimido contiene | | |
|--------------------------|----------------------------------|---------------------|
| SR. Nº | INGREDIENTE | CANTIDAD % en P/P |
| 01 | Compuesto 1 | 61,40 |
| 02 | Monohidrato de lactosa | 35,15 |
| 03 | Croscarmelosa sódica | 1,40 |
| 04 | Polivinilpirrolidona | 0,85 |
| 05 | Dióxido de silicio coloidal | 0,35 |
| 06 | Estearato de magnesio | 0,50 |
| 07 | Colorante amarillo de quinoleína | 0,35 |
| 08 | Alcohol isopropílico | Cantidad suficiente |

Ejemplo 24

20

Preparación de cápsulas

Procedimiento general

25 **[0139]** Los ingredientes 01 y 02 se pesaron por separado y se tamizaron a través de una malla 20 y se mezclaron. El ingrediente 03 se pesó y se tamizó a través de una malla 40. Todos los ingredientes se mezclaron y se lubricaron usando el ingrediente 04. La combinación se cargó en cápsulas de gelatina dura vacías usando herramientas mecánicas adecuadas.

Tabla 17: formulación en cápsulas del compuesto 1

| Cada cápsula contiene | | |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------|
| SR. Nº | INGREDIENTE | CANTIDAD % en P/P |
| 01 | Compuesto 1 | 98,59 |
| 02 | Celulosa microcristalina | 0,75 |
| 03 | Dióxido de silicio coloidal | 0,47 |
| 04 | Estearato de magnesio | 0,19 |

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio mediado por TNF- α , interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8) y molécula 1 de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), molécula 1 de adhesión vascular-celular (VCAM-1) y E-Selectina, en la que dicha composición comprende, como ingrediente activo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto de capítulos florales y fructíferos de la planta *Sphaeranthus indicus*, junto con vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 10 **2.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el extracto de *Sphaeranthus indicus* contiene 3a-hidroxi-5a,9-dimetil-3-metilen-3a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahidro-3H-napfto[1,2-b]furan-2-ona (compuesto 1) como un marcador bioactivo.
- 15 **3.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el extracto de *Sphaeranthus indicus* contiene el 2-9% del compuesto 1.
- 20 **4.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio mediado por TNF- α , interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8) y molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1), molécula 1 de adhesión vascular-celular (VCAM-1) y E-Selectina, en la que dicha composición, comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de 3a-hidroxi-5a,9-dimetil-3-metilen-3a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahidro-3H-napfto[1,2-b]furan-2-ona (compuesto 1) como un ingrediente activo junto con vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 25 **5.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha composición se formula para administración oral, tópica o transdérmica.
- 30 **6.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en enfermedad intestinal inflamatoria, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis psoriásica, osteoartritis, artritis reumatoide refractaria, artritis no reumatoide crónica, osteoporosis/reabsorción ósea, cardiopatía coronaria, aterosclerosis, vasculitis, colitis ulcerosa, psoriasis y síndrome de distrés respiratorio del adulto.
- 35 **7.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el trastorno inflamatorio es artritis reumatoide.
- 40 **8.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el trastorno inflamatorio es enfermedad intestinal inflamatoria.
- 45 **9.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el trastorno inflamatorio es colitis ulcerosa.
- 10.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el trastorno inflamatorio es aterosclerosis.
- 11.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el trastorno inflamatorio es psoriasis.
- 12.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que adicionalmente comprende al menos un agente antiinflamatorio.
- 50 **13.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, como se reivindica en la reivindicación 12, en el que el agente antiinflamatorio es seleccionado de prednisolona, hidrocortisona, metotrexato, sulfasalazina, naproxeno, diclofenaco o ibuprofeno.