

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 593**

51 Int. Cl.:

A61K 31/557	(2006.01)	A61P 21/02	(2006.01)
A61K 31/12	(2006.01)	A61P 29/00	(2006.01)
A61K 31/19	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
A61K 31/522	(2006.01)		
A61K 36/185	(2006.01)		
A61K 36/9066	(2006.01)		
A61K 45/06	(2006.01)		
A61P 1/04	(2006.01)		
A61P 17/02	(2006.01)		
A61P 19/02	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2005 E 05723839 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 1718312**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que contienen derivados de extracto de lúpulo y cafeína**

30 Prioridad:

27.02.2004 US 789817

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

24.04.2015

73 Titular/es:

**METAPROTEOMICS, LLC (100.0%)
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:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 534 593 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

Composiciones farmacéuticas que contienen derivados de extracto de lúpulo y cafeína

Antecedentes de la Invención

5 Composiciones farmacéuticas anti-inflamatorias sinérgicas y métodos afines que utilizan curcuminoides o metilxantinas.

Esta invención se refiere a composiciones que contienen ácido isoalfa reducido y cafeína.

La presente invención se refiere también a composiciones para uso en el tratamiento de la inflamación.

10 Las prostaglandinas (PGs) son hormonas ubicuas que funcionan a la vez como mediadores paracrinos y autocrinos que afectan a una miríada de cambios fisiológicos en el entorno celular inmediato. Los variados efectos fisiológicos de las PGs incluyen reacciones inflamatorias tales como artritis reumatoide y osteoartritis, control de la presión sanguínea, agregación plaquetaria, inducción del parto y agravación del dolor y la fiebre. El descubrimiento hace 30 años de que la aspirina y otros analgésicos no esteroideos inhibían la producción de PG identificó la síntesis de PG como una diana para el desarrollo de fármacos. Existen al menos 16 PGs diferentes en nueve clases químicas distintas, designadas PGA hasta PGI. Las PGs son parte de una mayor familia de compuestos que contienen 20 carbonos denominados eicosanoides; las mismas incluyen prostaciclina, tromboxano, y leucotrienos. El conjunto de PGs producidas varía dependiendo de la maquinaria enzimática de aguas abajo presente en un tipo de célula particular. Por ejemplo, las células endoteliales producen principalmente PGI₂, mientras que las plaquetas producen principalmente TXA₂.

20 El ácido araquidónico sirve como el sustrato primario para la biosíntesis de todas las PGs. La ciclooxigenasa (prostaglandin-endoperoxido-sintasa, EC 1.14.991, COX) cataliza el paso limitante de la velocidad en el metabolismo del ácido araquidónico a prostaglandina H₂ (PGH₂), que es metabolizada ulteriormente a diversas prostaglandinas, prostaciclina y tromboxano A₂ (véase Figura 1). Al principio de los años 1990, se estableció que COX existe en dos isoformas, a las que se hace referencia comúnmente como COX-1 y COX-2. Posteriormente se determinó que las proteínas COX-1 y COX-2 se derivan de distintos genes que divergieron mucho antes que las aves y los mamíferos. 25 Las PGs generadas por los caminos COX-1 y COX-2 son moléculas idénticas y por consiguiente tienen efectos biológicos idénticos. Sin embargo, COX-1 y COX-2, pueden generar un patrón único y cantidades variables de eicosanoides; por tanto, diferencias relativas en la activación de estas isozimas pueden dar como resultado respuestas biológicas muy diferentes. Las diferencias en la distribución tisular y regulación de COX-1 y COX-2 se consideran actualmente cruciales para los efectos tanto beneficiosos como adversos de los inhibidores de COX.

30 El concepto mantenido generalmente (dogma COX) es que COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos, mientras que COX-2 es la enzima inducible activada por estímulos proinflamatorios que incluyen mitógenos, citocinas y lipopolisacáridos (LPS) bacterianos en las células *in vitro* y en sitios inflamados *in vivo*. Basándose fundamentalmente en tales diferencias de expresión, COX-1 ha sido caracterizada como una enzima constitutiva y se cree que está implicada en el mantenimiento de funciones fisiológicas tales como citoprotección de 35 la mucosa gástrica, regulación del flujo sanguíneo renal, y control de la agregación plaquetaria. COX-2 se considera que media principalmente en la inflamación, aunque se encuentra expresión constitutiva en cerebro, el riñón y el tracto gastrointestinal.

40 Se cree que las prostaglandinas (PG) juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la mucosa gástrica humana. El dogma actual es que COX-1 es responsable de la síntesis de PG en la mucosa gástrica normal a fin de mantener la homeostasis mucosal, y que COX-2 es expresada por la mucosa gástrica normal a niveles bajos, con inducción de la expresión durante la curación de las úlceras, después de la exposición a endotoxinas o la estimulación de citocinas. Actualmente parece ser que tanto COX-1 como COX-2 tienen papeles fisiológicos importantes en la mucosa gástrica normal.

45 Los compuestos que inhiben la producción de PGs por COX han llegado a ser fármacos importantes en el control del dolor y la inflamación. Colectivamente, estos agentes se conocen como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs), siendo sus indicaciones principales osteoartritis y artritis reumatoide. Sin embargo, el uso de NSAIDs, y en particular de la aspirina, se ha extendido a la profilaxis de la enfermedad cardiovascular. A lo largo de la última década, se han dedicado esfuerzos considerables al desarrollo de nuevas moléculas que son inhibidores directos de la actividad enzimática de COX-2, con la inferencia de que estos compuestos deberían ser menos irritantes para el 50 estómago con el uso crónico.

El principal problema asociado con la determinación de la selectividad de COX-2 (es decir el efecto irritante gástrico bajo) es que las diferencias en la metodología del ensayo pueden tener efectos profundos sobre los resultados obtenidos. En la Tabla 1 se representan las categorías de los numerosos ensayos *in vitro* que se han desarrollado para ensayar y comparar las actividades inhibitoras relativas de NSAID y compuestos naturales contra COX-1 y COX-2. Estos sistemas de ensayo pueden clasificarse en tres grupos: (1) sistemas que utilizan enzimas animales, y 55 células o líneas de células animales, (2) ensayos que utilizan líneas de células humanas, o plaquetas y monocitos humanos, y (3) modelos actualmente en desarrollo que utilizan células humanas que son representativas de las

células diana para los efectos anti-inflamatorios y adversos de NSAID y suplementos dietéticos. Generalmente, los modelos que utilizan líneas de células humanas o plaquetas y monocitos humanos son el estándar actual, y no se dispone de modelos validados de células diana. Una línea de células gástricas humanas capaz de evaluar el potencial para efecto irritante gástrico es una necesidad crucial.

- 5 Las enzimas utilizadas pueden ser de origen animal o humano, pueden ser naturales o recombinantes, y pueden utilizarse como enzimas purificadas, en preparaciones microsómicas, o ensayos de células enteras. Otras variables del sistema incluyen la fuente de ácido araquidónico. La síntesis de PG puede medirse a partir de ácido araquidónico liberado endógenamente o ácido araquidónico añadido exógenamente. En el último caso, se utilizan concentraciones diferentes en los diferentes laboratorios.
- 10 Un ensayo ideal para la selectividad de COX-2 debería tener las características siguientes: (1) deberían utilizarse células enteras que contengan enzimas humanas naturales bajo control fisiológico normal concerniente a la expresión; (2) las células deberían ser también células diana para los efectos anti-inflamatorios y adversos de los compuestos; (3) COX-2 debería inducirse, simulando con ello un proceso inflamatorio, en lugar de expresarse constitutivamente; y (4) la síntesis de PG debería medirse por ácido araquidónico liberado de reservas endógenas en vez de por ácido araquidónico añadido exógenamente.
- 15

Tabla 1. Clasificación de los sistemas de ensayo para ensayos in vitro de evaluación de la selectividad de COX-2 de los compuestos anti-inflamatorios †

I. SISTEMAS DE ENSAYO		
A. ANIMAL	B. HUMANO	C. DIANA
Enzimas	Enzimas	Células de la Mucosa Gástrica Humana
Células	Células	Condrocitos Humanos
Líneas de células	Líneas de células	Sinoviocitos Humanos
D. OTRAS VARIABLES DEL SISTEMA		
1.	Fuente de ácido araquidónico – endógeno o exógeno	
2.	Diversos sistemas de expresión para replicación de genes de COX-1 y COX-2;	
3.	La presencia o ausencia de un agente inductor de COX-2;	
4.	Los agentes inductores de COX-2 se administran a concentraciones diferentes y durante periodos de tiempo diferentes;	
5.	Duración de incubación con el fármaco o con ácido araquidónico;	
6.	Variación de la concentración de proteína en el medio	

† Adaptado de Pairet, M. y van Ryn, J. *Inflamm. Res.* 47, Suplemento: 2S93-S101 (1998) e incorporado en esta memoria por referencia.

Ningún laboratorio ha desarrollado hasta ahora un ensayo ideal para la selectividad de COX-2. El sistema de células enteras utilizado más comúnmente para productos con prescripción (Rx) y de venta sin receta (OTC) es el ensayo de sangre humana entera desarrollado por el William Harvey Institute (Warner et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7563-7568 (1999)). Hasta la fecha, este formato de ensayo ha desarrollado más datos que respaldan relevancia clínica que ningún otro. Sin embargo, nuevas investigaciones acerca de la función de la expresión constitutiva de COX-2 en la mucosa gástrica normal requieren revisar la relevancia del uso de plaquetas para modelizar la inhibición de COX-1 en ausencia de COX-2. La extrapolación de gastrotoxicidad a partir de estudios de plaquetas ya no descansa sobre una base molecular sólida. La validación de una línea de células de la mucosa gástrica humana para establecer la potencial toxicidad tisular para la diana de los inhibidores de ciclooxigenasas representa una necesidad crítica para el desarrollo de agentes anti-inflamatorios seguros y eficaces.

Una formulación ideal para el tratamiento de la inflamación podría inhibir la inducción y actividad de COX-2 sin inhibir la síntesis de PGE₂ en las células de la mucosa gástrica. Sin embargo, los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos convencionales carecen de la especificidad de inhibición de COX-2 sin afectar a la síntesis gástrica de PGE₂ y presentan el riesgo de causar daños en el sistema gastrointestinal, cuando se utilizan durante periodos prolongados. De hecho, incluso los fármacos antiinflamatorios últimamente desarrollados tales como rofecoxib (Vioxx®, Merck & Co., Inc.) y celecoxib (Celebrex® Pfizer, Inc.) producen toxicidad gástrica indeseable en forma de hemorragias espontáneas inducidas y retardo de la curación de las úlceras gástricas.

Toxicidad de los NSAIDs

Se sabe que los NSAIDs causan problemas de salud graves con inclusión de hemorragia gástrica y daños al riñón. En los Estados Unidos, existen más de 13 millones de usuarios regulares de NSAIDs, 70 millones de prescripciones escritas de NSAIDs cada año, y 30.000 millones de tabletas de NSAIDs vendidas sin receta anualmente. La enfermedad inducida por NSAID causa 103.000 hospitalizaciones por año y un número estimado de 16.500 fallecimientos anualmente. El 20 por ciento de todos los usuarios crónicos de NSAID desarrollarán una úlcera péptica. Los usuarios de NSAID presentan un mayor riesgo -3 a 4 veces mayor -de hemorragia gastrointestinal superior, perforación, o ambas. El ochenta y uno por ciento de los pacientes hospitalizados con complicaciones graves inducidas por NSAID no tenían síntoma gastrointestinal alguno previo. Las personas con más de 60 años de edad tienen una probabilidad notablemente mayor de sufrir complicaciones asociadas con el uso de NSAIDs. Además, el 21% de todas las reacciones adversas de los fármacos en los Estados Unidos se deben al uso de NSAIDs.

Se ha demostrado que los nuevos inhibidores de COX-2 selectivos tales como celecoxib y rofecoxib ofrecen una alternativa más segura a la mayoría de los NSAIDs. No obstante, estudios recientes indican que los inhibidores selectivos de COX-2 no eliminan por completo la toxicidad gastrointestinal. De hecho, en los casos de inflamación o ulceración del tracto gastrointestinal, la prescripción de inhibidores de COX-2 puede retardar la curación de la úlcera.

Por tanto, sería útil identificar una formulación natural de compuestos que pudieran inhibir o prevenir específicamente la síntesis de prostaglandinas por COX-2 con poco o ningún efecto sobre la síntesis de PGE₂ en la mucosa gástrica. Una formulación de este tipo sería útil para preservar la salud de los tejidos de las articulaciones, para tratamiento de la artritis u otras condiciones inflamatorias. El término "inhibidor de COX-2 específico o selectivo" fue acuñado para abarcar compuestos o mezclas de compuestos que inhiben selectivamente COX-2 sobre COX-1. No obstante, si bien la implicación es que una selectividad calculada de este tipo dará como resultado menor potencial de irritación gástrica, a no ser que los materiales de ensayo se evalúen en células gástricas, el término "inhibidor selectivo de COX-2" no lleva consigo el aseguramiento de la seguridad de las células gastrointestinales. Únicamente el ensayo de la acción de los compuestos en los tejidos diana, células inflamatorias y células de la mucosa gástrica identificará aquellos agentes con potencial bajo para irritación del estómago.

Por tanto, sería útil identificar una composición que pudiera inhibir o prevenir específicamente la expresión de actividad enzimática de COX-2 en las células inflamatorias, en tanto que tuviera poco o ningún efecto sobre la síntesis de PGE-2 en las células de la mucosa gástrica de tal modo que pudieran utilizarse estas formulaciones sin trastorno gastrointestinal alguno. Adicionalmente, tales formulaciones debería permitir la curación de las condiciones ulcerosas preexistentes en el estómago. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona además ventajas afines.

US 2003/0096027 da a conocer una formulación que comprende, como primer componente, una cantidad eficaz de una especie química curcuminoide y una cantidad eficaz de un segundo componente seleccionado del grupo constituido por una especie de ácido alfa o una especie de ácido beta o derivados de las mismas.

Sumario de la Invención

El alcance de protección viene definido por las reivindicaciones. La presente invención proporciona una composición terapéutica que comprende una fracción aislada o derivada de lúpulo y cafeína, en donde la fracción aislada o derivada de lúpulo comprende un ácido isoalfa reducido del Género A que tiene la fórmula que se define en la reivindicación 1.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 representa la inducción de ciclooxigenasa-2 y el metabolismo del ácido araquidónico a prostaglandinas y otros eicosanoides por las enzimas ciclooxigenasa. La acción de los agentes anti-inflamatorios no esteroideos es por inhibición directa de las enzimas ciclooxigenasa.

La Figura 2 muestra una reseña de fracciones y compuestos que pueden obtenerse a partir de lúpulo.

La Figura 3 representa fracciones ilustrativas aisladas o derivadas de lúpulo. La Figura 3A muestra el Género de ácidos alfa (AA) y las especies representativas humulona (R=-CH₂CH(CH₃)₂), cohumulona (R=-CH(CH₃)₂), y adhumulona (R=-CH(CH₃)CH₂CH₃); la Figura 3B muestra el Género de ácidos isoalfa (IAA) y las especies representativas isohumulona (R=-CH₂CH(CH₃)₂), isocohumulona (R=-CH(CH₃)₂), e isoadhumulona (R=-CH(CH₃)CH₂CH₃); la Figura 3C muestra el Género de ácido isoalfa isomerizado reducido (RIAA) y las especies representativas dihidro-isohumulona (R=-CH₂CH(CH₃)₂), dihidro-isocohumulona (R=-CH(CH₃)₂), y dihidro-isoadhumulona (R=-CH(CH₃)CH₂CH₃); la Figura 3D muestra el Género de ácidos tetrahidro-isoalfa (THIAA) and las especies representativas tetrahidro-isohumulona (R=-CH₂CH(CH₃)₂), tetrahidro-isocohumulona ((R=-CH(CH₃)₂), y tetrahidro-isoadhumulona (R=-CH(CH₃)CH₂CH₃); la Figura 3E muestra el Género de ácido hexahidro-isoalfa (HHIAA) con las especies representativas hexahidro-isohumulona (R=-CH₂CH(CH₃)₂), hexahidro-isocohumulona (R=-CH(CH₃)₂), y hexahidro-isoadhumulona (R=-CH(CH₃)CH₂CH₃).

Las Figuras 4 A-F ilustran la estructura química general del Género curcuminoide (A) y curcuminoides ilustrativos: curcumina (B), desmetoxicurcumina (C), bisdesmetoxicurcumina (D), el isómero geométrico cis-trans de curcumina (E) y ciclocurcumina (F).

5 Las Figuras 5 A-N muestran las estructuras de metilxantinas ilustrativas: cafeína (A), teofilina (B), 1-propargil-3,7-dimetil-xantina (C); 7-propargil-1,3-dimetil-xantina (D); 3-propargil-1,7-dimetil-xantina (E); 1,3,7-tripropargil-xantina (F); 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (G); 1,3,7-tripropil-xantina (H); 7-benzil-IBMX (I); 1-propil-3,7-dimetil-xantina (J); 1,3-dipropil-7-metil-xantina (K); 1,3-dipropil-7-propargil-xantina (L); 3,7-dimetil-1-propil-xantina (M); y 7-alil-1,3-dimetil-xantina (N).

10 La Figura 6 muestra una representación gráfica del parámetro (Índice de Combinación) computado frente a la concentración de ácidos alfa isomerizados reducidos (RIAA) para ratios RIAA:curcumina de 100:1 (Figura 6A), 10:1 (Figura 6B), 3:1 (Figura 6C), 3:2 (Figura 6D), 1:1 (Figura 6E), 2:3 (Figura 6F), 1:10 (Figura 6G), 1:100 (Figura 6H).

La Figura 7 muestra una representación gráfica del parámetro Índice de Combinación computado frente a la concentración de ácidos alfa isomerizados reducidos (RIAA) para ratios RIAA:cafeína de 100:1 (Figura 7A), 10:1 (Figura 7B), 3:1 (Figura 7C), 3:2 (Figura 7D), 1:1 (Figura 7E), 2:3 (Figura 7F), 1:10 (Figura 7G), 1:100 (Figura 7H).

15 Descripción Detallada de la Invención

La presente invención proporciona composiciones para reducción de la inflamación. En particular, la invención proporciona una fracción aislada o derivada de lúpulo (*Humulus lupulus*) en combinación con cafeína. La invención proporciona extractos de lúpulo (*Humulus lupulus*) o derivados de los mismos en combinación con cafeína para uso en el tratamiento de la inflamación en un paciente profiláctica y/o terapéuticamente.

20 La toxicidad aguda de los derivados de lúpulo es muy baja. Por tanto, pueden utilizarse en caso necesario dosis relativamente altas de derivados de lúpulo sin efectos tóxicos debidos al lúpulo. Las dosis tóxicas son considerablemente mayores que las dosis terapéuticas contempladas de acuerdo con la presente invención.

25 Como se utiliza en esta memoria, el término "suplemento dietético" se refiere a composiciones consumidas que afectan a cambios estructurales o funcionales en fisiología. El término "composición terapéutica" se refiere a compuestos administrados para tratar o prevenir una enfermedad o para mejorar un signo o síntoma asociado con una enfermedad.

Como se utiliza en esta memoria, el término "cantidad eficaz" significa una cantidad necesaria para conseguir un resultado seleccionado. Una cantidad de este tipo puede ser determinada fácilmente sin experimentación excesiva por una persona con experiencia ordinaria en la técnica.

30 Como se utiliza en esta memoria, el término "sustancial" significa que es en gran parte, pero no totalmente el que se especifica.

Como se utiliza en esta memoria, el término "inhibidor de COX" se refiere a una composición de compuestos que es capaz de inhibir la actividad o expresión de las enzimas COX-2 o es capaz de inhibir o reducir la gravedad, con inclusión de dolor y tumefacción, de una respuesta inflamatoria grave.

35 Como se utiliza en esta memoria, los términos "derivados" o una materia "derivada" se refieren a una sustancia química relacionada estructuralmente como otra sustancia y que puede obtenerse teóricamente a partir de ella, es decir, una sustancia que puede producirse a partir de otra sustancia. Los derivados pueden incluir compuestos obtenidos por una reacción química. Los métodos de producción de derivados de compuestos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

40 Como se utiliza en esta memoria, el término "célula inflamatoria" se refiere a aquellos miembros celulares del sistema inmunitario, por ejemplo los linfocitos B y T, neutrófilos o macrófagos, implicados en la síntesis de prostaglandinas en respuesta a señales inflamatorias tales como interleucinas, factor de necrosis tumoral, bradiquinina, histamina o componentes derivados de bacterias.

45 Como se utiliza en esta memoria, el término "células diana" se refiere a aquella población de células en la cual se desea la inhibición de la síntesis de PGE₂ u otra prostaglandina, tal como células inflamatorias o células tumorales. Alternativamente, "células no-diana" se refiere a aquella población de células en la cual no se desea la inhibición de la síntesis de PGE₂ u otra prostaglandina, tal como las células de la mucosa gástrica, neurales o renales.

50 Como se utiliza en esta memoria, el término "extracto de lúpulo" se refiere al material sólido resultante de (1) exponer un producto de planta de lúpulo a un disolvente, (2) separar el disolvente de los productos de la planta de lúpulo, y (3) eliminar el disolvente.

Como se utiliza en esta memoria, el término "disolvente" se refiere a un líquido de naturaleza acuosa u orgánica que posee las características necesarias para extraer material sólido del producto de la planta de lúpulo. Ejemplos de disolventes podrían incluir, pero sin carácter limitante, agua, vapor, agua sobrecalentada, metanol, etanol, hexano, cloroformo, cloruro de metileno, CO₂ líquido o supercrítico, N₂ líquido, o combinaciones de tales materiales.

Como se utiliza en esta memoria, el término "extracto de CO₂" se refiere al material sólido resultante de exponer un producto de planta de lúpulo a una preparación de CO₂ líquido o supercrítico seguido por la eliminación del CO₂.

Como se utiliza en esta memoria, el término "lúpulo agotado" se refiere al residuo sólido e hidrófilo del extracto de lúpulo.

- 5 Como se utiliza en esta memoria, el término "ácido alfa" se refiere a compuestos conocidos colectivamente como humulonas pueden aislarse a partir de productos de planta de lúpulo que incluyen, entre otros, humulona, cohumulona, adhumulona, hulupona e isoprehumulona.

- 10 Como se utiliza en esta memoria, el término "ácido isoalfa" se refiere a compuestos aislados a partir de productos de plantas de lúpulo y que se han isomerizado posteriormente. La isomerización de los ácidos alfa puede ocurrir térmicamente, por ejemplo por ebullición. Ejemplos de ácidos isoalfa incluyen, pero sin carácter limitante, isohumulona, isocohumulona, e isoadhumulona.

- 15 Como se utiliza en esta memoria, el término "ácido isoalfa reducido" se refiere a ácidos alfa aislados de productos de plantas de lúpulo y que subsiguientemente se han isomerizado y reducido, incluyendo formas cis y trans. Ejemplos de ácidos isoalfa reducidos (RIAA) incluyen, pero sin carácter limitante, dihidro-isohumulona, dihidro-isocohumulona, y dihidro-isoadhumulona.

Como se utiliza en esta memoria, el término "ácido tetrahidro-isoalfa" se refiere a cierta clase de ácido isoalfa reducido. Ejemplos de ácido tetrahidro-isoalfa (TIAA) incluyen, pero sin carácter limitante, tetrahidro-isohumulona, tetrahidro-isocohumulona y tetrahidro-isoadhumulona.

- 20 Como se utiliza en esta memoria, el término "ácido hexahidro-isoalfa" se refiere a cierta clase de ácido isoalfa reducido. Ejemplos de ácidos hexahidro-isoalfa (HHIAA) incluyen, pero sin carácter limitante, hexahidro-isohumulona, hexahidro-isocohumulona y hexahidro-isoadhumulona.

Como se utiliza en esta memoria, el término "fracción de ácido beta" se refiere a compuestos conocidos colectivamente como lupulonas que incluyen, entre otros, lupulona, colupulona, adlupulona, tetrahidro-isolupulona, y hexahidrocolupulona.

- 25 Como se utiliza en esta memoria, el término "fracción de aceite esencial" se refiere a una mezcla compleja de componentes que incluyen, entre otros, mirceno, humuleno, beta-cariofileno, undecano-2-ona, y 2-metil-but-3-en-ol.

- 30 Como se utiliza en esta memoria, el término "metilxantina" se refiere a un compuesto clasificado como un derivado de xantina metilado, que incluye pero sin carácter limitante cafeína; teobromina; teofilina; aminofilina; doxofilina; pentoxifilina; 8-oxopentoxifilina; 8-oxolisofilina; y lisofilina. Metilxantinas ilustrativas se muestran en la Figura 5, con inclusión de cafeína; teofilina; 1-propargil-3,7-dimetil-xantina; 7-propargil-1,3-dimetil-xantina; 3-propargil-1,7-dimetil-xantina; 1,3,7-tripropargil-xantina; 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX); 1,3,7-tripropil-xantina; 7-bencil-IBMX; 1-propil-3,7-dimetil-xantina; 1,3-dipropil-7-metil-xantina; 1,3-dipropil-7-propargil-xantina; 3,7-dimetil-1-propil-xantina; y 7-alil-1,3-dimetil-xantina. Diversas metilxantinas son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Daly et al., Pharmacol. 42:309-321 (1991); Ukena et al., Life Sci. 39:743-750 (1986); Choi et al., Life Sci. 43:387-398 (1988); Daly et al., J. Med. Chem. 29:1305-1308 (1986); Daly et al., Prog. Clin. Biol. Res. 230:41-63 (1987), cada uno de los cuales se incorpora en esta memoria por referencia.

- 40 Como se utiliza en esta memoria, el término "curcuminoide" se refiere a un compuesto clasificado como una curcumina o derivado de la misma, con inclusión, pero sin carácter limitante, de curcumina, desmetoxicurcumina, bisdesmetoxicurcumina, cis-trans-curcumina y ciclocurcumina. Curcuminoideos ilustrativos se muestran en la Figura 4.

Como se utiliza en esta memoria, "conjugados" de compuestos significa compuestos unidos covalentemente o conjugados a un miembro seleccionado del grupo constituido por mono- o di-sacáridos, aminoácidos, sulfatos, succinatos, acetatos, y glutatión. El mono- o di-sacárido puede ser un miembro seleccionado del grupo constituido por glucosa, manosa, ribosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, maltosa, y fructosa.

- 45 La invención se refiere a la utilización de extractos de lúpulo para reducir la inflamación. La extracción del lúpulo en una forma u otra se remonta a más de 150 años hasta principios del siglo XIX cuando se intentó por primera vez la extracción en agua y etanol. Todavía hoy en día, está disponible en Europa un extracto etanólico, pero con mucho los extractos predominantes son extractos en disolventes orgánicos (por ejemplo, hexano) y extractos en CO₂ (supercrítico y líquido). El CO₂ (típicamente a presión de 60 bares y 50 a 10°C) se encuentra en estado líquido y es un disolvente no polar relativamente moderado, y muy específico para las resinas blandas y aceites de lúpulo. Más allá del punto crítico, típicamente a presión de 300 bares y 60°C, el CO₂ tiene las propiedades tanto de gas como de líquido y es un disolvente mucho más energético. La composición de los diversos extractos se compara en la Tabla 2.

- 55 En su forma más simple, la extracción del lúpulo implica molienda, peletización y nueva molienda del lúpulo para esparcir la lupulina, hacer pasar un disolvente a través de una columna de relleno para recoger los componentes resinicos y finalmente, eliminar el disolvente para producir un extracto de resina entero o "puro".

Tabla 2. Extractos de lúpulo (Porcentaje p/p)

Componente.	Lúpulo	Disolvente orgánico	CO ₂ Super-crítico	CO ₂ 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
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

5 Las sustancias extractivas orgánicas principales son disolventes enérgicos y, además de virtualmente la totalidad de los componentes de lupulina, los mismos extraen pigmentos de la planta, ceras cuticulares, agua y materiales solubles en agua.

10 El CO₂ supercrítico es más selectivo que los disolventes orgánicos y extrae menos cantidad de los taninos y ceras y menos agua y por tanto componentes solubles en agua. El mismo extrae algo de los pigmentos de la planta como clorofila, pero bastante menos que lo hacen los disolventes orgánicos. El CO₂ líquido es el disolvente más selectivo utilizado comercialmente para el lúpulo y produce por tanto la resina entera y extracto de aceite más puros. El mismo extrae escasamente las resinas duras o taninos, niveles muy inferiores de ceras vegetales, no extrae en absoluto pigmento alguno de la planta y menos agua y materiales solubles en agua.

15 Como consecuencia de esta selectividad y de las propiedades disolventes más suaves, el rendimiento absoluto de extracto de CO₂ líquido por unidad de peso de lúpulo es menor que cuando se utilizan los otros disolventes mencionados. Adicionalmente, el rendimiento de ácidos alfa con CO₂ líquido (89-93%) es menor que el de CO₂ supercrítico (91-94%) o los disolventes orgánicos (93-96%). Después de la extracción, tiene lugar un proceso de eliminación del disolvente, que para los disolventes orgánicos implica calentamiento a fin de causar volatilización. A pesar de esto, quedan en el extracto cantidades traza de disolvente. La eliminación de CO₂, en cambio, implica simplemente un relajamiento de la presión para volatilizar el CO₂.

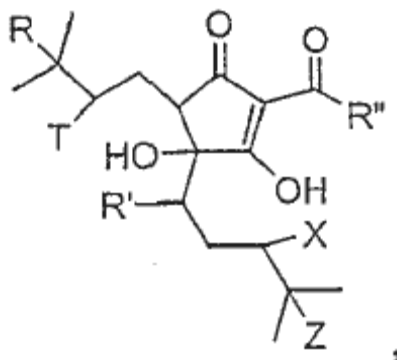
20 Como se muestra en la Figura 3, los extractos de CO₂ del lúpulo pueden fraccionarse en componentes, que incluyen aceite de lúpulo, ácidos beta, y ácidos alfa. Los aceites de lúpulo incluyen, pero sin carácter limitante, humuleno, beta-cariofileno, mirceno, farnesceno, gamma-cadineno, alfa-selineno, y alfa-cadineno. Los ácidos beta incluyen, pero sin carácter limitante lupulona, colupulona, adlupulona, tetrahidro-isohumulona, y hexahidrocolupulona, conocidos comúnmente como lupulonas. Los ácidos beta pueden isomerizarse y reducirse. Los ácidos beta se reducen para dar ácidos tetra-beta. Los ácidos alfa incluyen, pero sin carácter limitante, humulona, cohumulona, adhumulona, hulupona, e isoprehumulona. Los ácidos alfa pueden isomerizarse para dar ácidos isoalfa. Los ácidos iso-alfa pueden reducirse para dar ácidos isoalfa reducidos, ácidos tetrahidro-isoalfa, y ácidos hexahidro-isoalfa.

30 La identificación de humulona a partir del extracto de lúpulo como inhibidor de la resorción ósea se consigna en Tobe et al. (Biosci. Biotech. Biochem. 61(1): 158-159 (1997)). Estudios posteriores por el mismo grupo caracterizaron el mecanismo de acción de la humulona como inhibición de la transcripción del gen COX-2 después de la estimulación por TNF-alfa de las células MC3T3 E1 (Yamamoto, FEBS Letters 465:103-106 (2000)). Se llegó a la conclusión de que la acción de humulona (también humulón) era similar a la de los glucocorticoides, pero que la humulona no funcionaba a través del receptor de glucocorticoides. Si bien estos resultados establecen que la humulona inhibe la síntesis de PGE₂ en las células MC3T3 (osteoblastos) al nivel génico, un experto en la técnica no imaginaría que estos resultados se darían necesariamente en las células inflamatorias inmunes u otras líneas de células. Como se describe en esta memoria, los compuestos y derivados de lúpulo exhiben un alto grado de selectividad tisular en células diana y no diana. Adicionalmente, los derivados de lúpulo descritos son estructuralmente distintos del ácido alfa humulona.

40 Se proporcionan composiciones que contienen al menos una fracción aislada o derivada de lúpulo (*Humulus lupulus*). Ejemplos de fracciones aisladas o derivadas de lúpulo son ácidos alfa, ácidos isoalfa, ácidos isoalfa reducidos, ácidos tetrahidro-isoalfa, ácidos hexahidro-isoalfa, ácidos beta, y lúpulo agotado. Fracciones aisladas o derivadas de lúpulo incluyen, pero sin carácter limitante, cohumulona, adhumulona, isohumulona, isocohumulona, isoadhumulona, dihidro-isohumulona, dihidro-isocohumulona, dihidro-isoadhumulona, tetrahidro-isohumulona, tetrahidro-isocohumulona, tetrahidro-isoadhumulona, hexahidro-isohumulona, hexahidro-isocohumulona, y

hexahidro-isoalhumulona. Los compuestos preferidos pueden llevar también sustituyentes, tales como halógenos, éteres, y ésteres.

Los compuestos de las fracciones aisladas o derivadas de lúpulo pueden representarse por el supragénero siguiente:



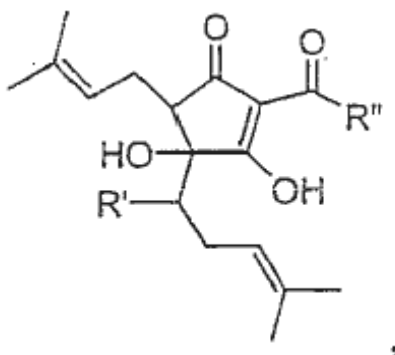
5

(Supragénero),

en donde R' se selecciona del grupo constituido por carbonilo, hidroxilo, OR, y OCOR, en donde R es alquilo; en donde R'' se selecciona del grupo constituido por CH(CH₃)₂, CH₂CH(CH₃)₂, y CH(CH₃)CH₂CH₃; y en donde R, T, X, y Z se seleccionan independientemente del grupo constituido por H, F, Cl, Br, I, y orbital π, con la salvedad de que si uno de R, T, X, o Z es un orbital π, entonces el R, T, X, o Z adyacente es también un orbital π, formando con ello un enlace doble.

10

Conforme a la presente invención, los compuestos de las fracciones aisladas o derivadas de lúpulo se representan por el Género siguiente:



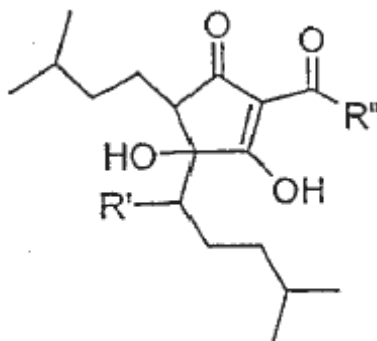
15

(Género A),

en donde R' se selecciona del grupo constituido por hidroxilo, y en donde R'' se selecciona del grupo constituido por CH(CH₃)₂, CH₂CH(CH₃)₂, y CH(CH₃)CH₂CH₃. Estructuras ilustrativas del Género A incluyen ácidos isoalfa reducidos tales como dihidro-isoalhumulona, dihidro-isocohumulona, dihidro-isoalhumulona, y conjugados éter o éster o modificaciones halogenadas del enlace doble.

20

Los compuestos de las fracciones aisladas o derivadas de lúpulo se pueden representar por el Género siguiente:



(Género B)

5 en donde R' se selecciona del grupo constituido por carbonilo, hidroxilo, OR, y OCOR, en donde R es alquilo; y en donde R'' se selecciona del grupo constituido por CH(CH₃)₂, CH₂CH(CH₃)₂, y CH(CH₃)CH₂CH₃. Estructuras ilustrativas del Género B incluyen ácidos tetrahidro-isoalfa, tales como tetrahidro-isohumulona, tetrahidro-isocohumulona y tetrahidro-isoadhumulona y análogos, y ácidos hexahidro-isoalfa tales como hexahidro-isohumulona, hexahidro-isocohumulona y hexahidro-isoadhumulona, y conjugados éter o éster.

10 Como se muestra en la Figura 3, ejemplos de compuestos de un ingrediente aislado o derivado de lúpulo incluyen, pero sin carácter limitante, humulona, cohumulona, adhumulona, isohumulona, isocohumulona, isoadhumulona, dihidro-isohumulona, dihidro-isocohumulona, dihidro-isoadhumulona, tetrahidro-isohumulona, tetrahidro-isocohumulona, tetrahidro-isoadhumulona, hexahidro-isohumulona, hexahidro-isocohumulona, y hexahidro-isoadhumulona. Los compuestos pueden llevar sustituyentes, como se muestra en la fórmula anterior.

15 Los derivados de lúpulo son compuestos conocidos que existen naturalmente en las plantas y se encuentran en productos alimenticios y bebidas. Los mismos se pueden preparar por cualquiera de los métodos de extracción y procesamiento conocidos en la técnica. Los derivados de lúpulo se pueden preparar directamente a partir de material vegetal de cualquier manera conocida. Los derivados de lúpulo pueden purificarse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por recristalización a partir de disolventes acuoso-orgánicos tales como alcoholes acuosos. Modificaciones sintéticas de los derivados de lúpulo se pueden preparar conforme a métodos conocidos en
20 la técnica farmacéutica de modificación de fármacos.

Dosificación

Adicionalmente, se proporcionan conforme a la presente invención formulaciones farmacéuticas de formas de dosificación oral que comprenden una cantidad eficaz de derivados de lúpulo seleccionados de dicho ácido isoalfa reducido que es un miembro del Género A que tiene la fórmula que se ha definido arriba para liberación del
25 ingrediente activo en un sitio deseado en el tracto gastrointestinal, por ejemplo en el estómago y/o el duodeno conforme a técnicas de formulación conocidas, por ejemplo, tabletas de liberación lenta. De acuerdo también con la invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz tolerada de derivados de lúpulo, seleccionados de dicho ácido isoalfa reducido que es un miembro del Género A que tiene la fórmula arriba definida. Debido a su baja toxicidad, pueden emplearse dosis elevadas de derivados de lúpulo para producir
30 resultados útiles, dependiendo del efecto particular que se desee.

Los derivados de lúpulo son particularmente adecuados para administración oral. Por tanto, los derivados de lúpulo pueden formularse para uso oral, a saber: tabletas, tabletas recubiertas, grageas, cápsulas, polvos, granulados y tabletas solubles, y formas líquidas, por ejemplo, suspensiones, dispersiones o soluciones, opcionalmente junto con un ingrediente activo adicional, tal como un curcuminóide o metilxantina.

35 La invención se extiende a un método de preparación de tales composiciones farmacéuticas que se describen en esta memoria y composiciones preparadas de este modo. Las composiciones se pueden producir por un método que comprende mezclar derivados de lúpulo con un portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente con una sustancia analgésica y/o anti-inflamatoria y/u otro u otros compuestos. Métodos para preparación de una composición farmacéutica son bien conocidos por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, Genarro, L., ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, edición 18^a, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1990)).
40

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de la actividad de la composición particular, la vía de administración, la gravedad de la afección a tratar o prevenir, y la condición e historia médica previa del paciente sometido a tratamiento. Sin embargo, está dentro de la experiencia en la técnica comenzar con dosis de la

composición a niveles inferiores al requerido para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se consigue el efecto deseado. Si se desea, la dosis diaria eficaz puede dividirse en dosis múltiples para propósitos de administración, por ejemplo, 2 a 4 dosis separadas por día. Debe entenderse, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores

5 que incluyen peso corporal, estado general de salud, dieta, tiempo y vía de administración, combinación con otras composiciones y gravedad de la condición particular a tratar o prevenir.

Se proporcionan métodos que incluyen suministrar una cantidad eficaz de fracciones de lúpulo, compuestos de lúpulo, o derivados de lúpulo. Por ejemplo, puede formularse una dosis diaria de las composiciones que suministra aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10.000 mg de una fracción de lúpulo, por ejemplo, ácido alfa, ácido isoalfa, ácido isoalfa reducido, ácido tetrahidro-isoalfa, ácido hexahidro-isoalfa, ácido beta, lúpulo agotados, u otras fracciones de lúpulo, por día. En particular, puede formularse una dosis diaria eficaz de composiciones para suministrar aproximadamente 50 a aproximadamente 7500 mg de fracción de lúpulo, por ejemplo, ácidos alfa, ácido isoalfa, ácido isoalfa reducido, ácido tetrahidro-isoalfa, ácido hexahidro-isoalfa, ácido beta, lúpulo agotados, u otras fracciones de lúpulo, por día. Por ejemplo, puede formularse una dosis diaria eficaz de composiciones para suministrar aproximadamente 100 mg a aproximadamente 5000 mg, aproximadamente 200 mg a aproximadamente 3000 mg, aproximadamente 300 mg a aproximadamente 2000 mg, aproximadamente 500 mg a aproximadamente 1000 mg de fracción de lúpulo por día. En una realización, la dosis diaria eficaz se administra una o dos veces al día. Una determinada realización proporciona una composición que comprende aproximadamente 0,5 a aproximadamente 500 mg de ácido isoalfa o ácido isoalfa reducido, por ejemplo, aproximadamente 50 a aproximadamente 300 mg o aproximadamente 100 a aproximadamente 200 mg de ácido isoalfa o ácido isoalfa reducido por día. En otra realización, se proporciona una composición que comprende aproximadamente 10 a aproximadamente 3000 mg de ácido isoalfa reducido, ácido tetrahidro-isoalfa, o ácido hexahidro-isoalfa por día, por ejemplo, aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 mg, aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 200 a aproximadamente 750 mg, o aproximadamente 250 a aproximadamente 500 mg de ácido isoalfa reducido, ácido tetrahidro-isoalfa, o ácido hexahidro-isoalfa por día. Otra determinada realización adicional proporciona una composición que comprende aproximadamente 50 a aproximadamente 7500 mg de lúpulo agotado por día, por ejemplo, aproximadamente 100 a aproximadamente 6000 mg, aproximadamente 200 a aproximadamente 5000 mg, aproximadamente 300 a aproximadamente 3000 mg, aproximadamente 500 a aproximadamente 2000 mg, o aproximadamente 1000 a aproximadamente 1500 mg de lúpulo agotado por día.

30 Una composición de realizaciones para aplicación tópica puede contener aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 por ciento en peso, por ejemplo aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 por ciento en peso, o aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 por ciento en peso, de un derivado de lúpulo. Tales composiciones pueden producir concentraciones en suero en el intervalo de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10 μ M, por ejemplo, aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5 μ M, aproximadamente 0,01 a 1 μ M, o aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 μ M de una fracción aislada o derivada de lúpulo o conjugado del mismo.

En una composición en la que una o más fracciones aisladas o derivadas de lúpulo se combinan con un curcuminoide, las ratios de la fracción aislada o derivada de lúpulo a un curcuminoide pueden variarse para optimizar un efecto deseado. Por ejemplo, como se describe en esta memoria, se observó sinergia de la inhibición de PGE₂ por una combinación de RIAA y curcumina en células endoteliales aórticas humanas (HAEC) (véase Ejemplo 3). Se observó sinergia entre RIAA y curcumina para inhibición de la biosíntesis de PGE₂ a ratios 100:1, 10:1 y 3:2 de RIAA:curcumina. Se observó una sinergia particularmente eficaz a una ratio 3:2 de RIAA:curcumina. Se proporciona una composición que contiene una fracción aislada o derivada de lúpulo en combinación con un curcuminoide tal como curcumina. En una realización, se proporciona una combinación de una fracción aislada o derivada de lúpulo, tal como RIAA, y un curcuminoide tal como curcumina en una cantidad y ratio eficaces para inhibir sinérgicamente PGE₂. La fracción aislada o derivada de lúpulo, tal como RIAA, y curcuminoide se combina en una ratio eficaz para inhibir sinérgicamente PGE₂, por ejemplo, una fracción aislada o derivada de lúpulo, tal como una ratio de RIAA a curcuminoide de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 1:10, por ejemplo, aproximadamente 100:1, aproximadamente 90:1, aproximadamente 80:1, aproximadamente 70:1, aproximadamente 60:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 40:1, aproximadamente 30:1, aproximadamente 20:1, o aproximadamente 10:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5 o aproximadamente 1:10. Una ratio particularmente útil de una fracción derivada de lúpulo a curcuminoide es aproximadamente 3:2.

55 Análogamente, en una composición en la que una o más fracciones aisladas o derivadas de lúpulo se combina(n) con una metilxantina, las ratios de la fracción aislada o derivada de lúpulo a una metilxantina pueden variarse para optimizar un efecto deseado. Por ejemplo, como se describe en esta memoria, se observó sinergia de la inhibición de PGE₂ por una combinación de RIAA y cafeína en células macrófagos RAW 264.7 (véase Ejemplo 4). Se observó sinergia entre RIAA y cafeína para inhibición de la biosíntesis de PGE₂ a ratios 100:1 a 1:100 de RIAA:cafeína. Se proporciona una composición que contiene una fracción aislada o derivada de lúpulo en combinación con una metilxantina. En una realización, se proporciona una combinación de una fracción aislada o derivada de lúpulo, tal como RIAA, y una metilxantina, tal como cafeína, en una cantidad y ratio eficaces para inhibir sinérgicamente PGE₂. La fracción aislada o derivada de lúpulo, tal como RIAA, y la metilxantina se combinan en una ratio eficaz para inhibir

60

sinérgicamente PGE₂, por ejemplo, una fracción aislada o derivada de lúpulo, tal como RIAA, a una ratio de metilxantina de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 1:100, por ejemplo, aproximadamente 100:1, aproximadamente 90:1, aproximadamente 80:1, aproximadamente 70:1, aproximadamente 60:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 40:1, aproximadamente 30:1, aproximadamente 20:1, o aproximadamente 10:1. Ratios particularmente útiles de una fracción aislada o derivada de lúpulo a metilxantina incluyen, por ejemplo, aproximadamente 3:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:15, aproximadamente 1:20, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1:30, aproximadamente 1:35, aproximadamente 1:40, aproximadamente 1:45, aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:55, aproximadamente 1:60, aproximadamente 1:65, aproximadamente 1:70, aproximadamente 1:75, aproximadamente 1:80, aproximadamente 1:85, aproximadamente 1:90, aproximadamente 1:95, o aproximadamente 1:100. Una metilxantina particularmente útil es cafeína.

Formulaciones

Las composiciones de la invención se pueden administrar en la forma de un suplemento dietético o composición terapéutica. Las composiciones se pueden administrar por vía oral, tópica, transdérmica, transmucosal, parenteral, y análogas, en unidades de dosificación apropiadas, según se desee. Las composiciones para aplicación dietética pueden incluir diversos aditivos tales como otros componentes naturales de metabolismo intermediario, vitaminas y minerales, así como ingredientes inertes tales como talco y estearato de magnesio que son excipientes estándar en la fabricación de tabletas y cápsulas. Por ejemplo, una realización comprende ingredientes activos de composiciones de la invención en combinación con glucosamina o sulfato de condroitina.

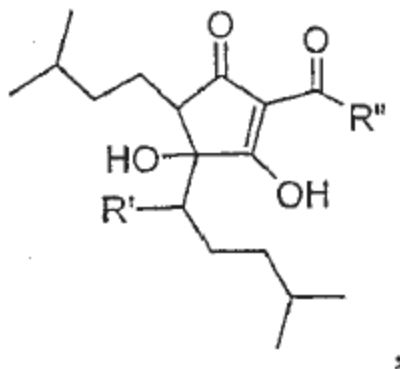
Como se utiliza en esta memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, edulcorantes y análogos, adecuados para administración a un individuo. Estos portadores farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de una amplia gama de materiales que incluyen, pero sin carácter limitante, diluyentes, aglomerantes y adhesivos, lubricantes, desintegrantes, agentes colorantes, agentes de aumento del volumen, agentes saborizantes, agentes edulcorantes y materiales diversos tales como tampones y absorbentes que pueden ser necesarios a fin de preparar una composición terapéutica particular. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Debe entenderse que las formulaciones contienen componentes que son compatibles con los ingredientes activos. En una realización, se incluyen talco y estearato de magnesio en la formulación. Otros ingredientes conocidos que afectan a la fabricación de una composición de la invención como una barra dietética o alimento funcional pueden incluir saborizantes, azúcares, aminoazúcares, proteínas y/o almidones modificados, así como grasas y aceites.

Suplementos dietéticos, lociones o composiciones terapéuticas de realizaciones de la invención pueden formularse de cualquier manera conocida por un experto en la técnica. En una realización, la composición se formula en una cápsula o tableta utilizando métodos disponibles para una persona con experiencia en la técnica. En forma de cápsulas o tabletas, la dosis diaria recomendada para un humano o animal adulto puede estar contenida en 1 a 6 cápsulas o tabletas. Las composiciones pueden formularse también en otras formas convenientes, tales como una solución o suspensión inyectable, una solución o suspensión de pulverización, una loción, chicle, pastilla, alimento o tentempié. Artículos de alimentación, bocadillo, chicle o pastilla pueden incluir cualquier ingrediente ingerible, con inclusión de edulcorantes, saborizantes, aceites, almidones, proteínas, frutas o extractos de frutas, hortalizas o extractos de hortalizas, cereales, grasas animales o proteínas. Así, las composiciones de la invención pueden formularse en cereales, tentempiés, tales como chips, barras, pastillas de goma, caramelos masticables o pastillas que se disuelven lentamente. Las composiciones de la invención se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades basadas en inflamación, tanto aguda como crónica. Formulaciones particularmente útiles de composiciones de la invención pueden reducir la respuesta inflamatoria y favorecer con ello la curación del tejido afectado, o prevenir el deterioro ulterior del mismo. Un portador farmacéuticamente aceptable puede utilizarse también en las composiciones y formulaciones de la invención.

Las composiciones de la invención se pueden utilizar, por ejemplo, para el tratamiento de la inflamación en un individuo, y para tratamiento de otros trastornos asociados con inflamación, tales como un analgésico en el tratamiento del dolor y las cefalalgias. Las composiciones de la invención se pueden utilizar para tratar una diversidad de condiciones, que incluyen, por ejemplo, cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, o enfermedades neurológicas. Las composiciones de la invención se pueden utilizar también para tratar condiciones, tales como infecciones de HIV-1, infecciones de rinovirus, y enfermedades cardiovasculares. Las composiciones de la invención se pueden utilizar para tratar artritis, con inclusión pero sin carácter limitante de artritis reumatoide, espondiloartropatías, artritis gotosa, osteoartritis, lupus eritematoso sistémico, y artritis juvenil.

Las composiciones de la invención se pueden utilizar adicionalmente en el tratamiento de asma, bronquitis, espasmos menstruales, tendinitis, bursitis, y condiciones relacionadas con la piel tales como psoriasis, eccema, quemaduras y dermatitis. Las composiciones se pueden utilizar también para tratar condiciones gastrointestinales tales como enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, gastritis, síndrome de intestino irritable y colitis ulcerosa, y para la prevención o tratamiento de cánceres tales como el cáncer colorrectal.

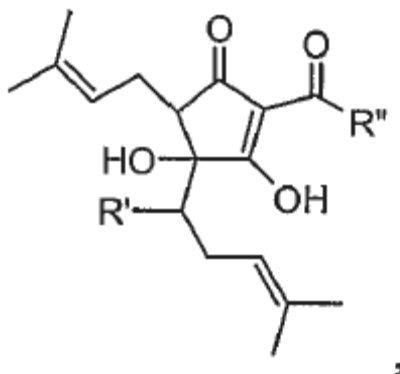
- Adicionalmente, las composiciones de la invención se pueden utilizar en el tratamiento de la inflamación en enfermedades tales como enfermedades vasculares, dolores de cabeza de tipo migraña, periartritis nodosa, tiroiditis, anemia aplásica, enfermedad de Hodgkin, escleroderma, fiebre reumática, diabetes tipo I, miastenia grave, esclerosis múltiple, sarcoidosis, síndrome nefrótico, síndrome de Behchet, polimiositis, gingivitis, hipersensibilidad, tumefacción subsiguiente a lesión, isquemia miocárdica, enfermedad periodontal, fibromialgia, dermatitis atópica, insulinitis y análogos. Las composiciones de la invención pueden utilizarse también en el tratamiento de enfermedades oftálmicas, tales como retinopatías, conjuntivitis, uveítis, fotofobia ocular, y de lesión aguda del tejido ocular. Las composiciones de la invención pueden utilizarse adicionalmente en el tratamiento de inflamación pulmonar, tal como la asociada con infecciones virales y fibrosis quística.
- 10 Adicionalmente, las composiciones de la invención se pueden utilizar para el tratamiento de ciertos trastornos del sistema nervioso tales como demencias corticales con inclusión de la enfermedad de Alzheimer. Las composiciones de la invención pueden utilizarse también en el tratamiento de rinitis alérgica, síndrome de dificultad respiratoria, síndrome de choque endotóxico, aterosclerosis, y lesión del sistema nervioso central resultante de derrame cerebral, isquemia y traumatismo.
- 15 En una realización, se proporciona una composición que comprende una fracción aislada o derivada de lúpulo y una metilxantina. La fracción aislada o derivada de lúpulo puede seleccionarse del grupo de ácidos alfa, ácidos isoalfa, ácidos isoalfa reducidos, ácidos tetrahidro-isoalfa, ácidos hexahidro-isoalfa, ácidos beta, y lúpulo agotado. La fracción aislada o derivada de lúpulo puede ser también un compuesto de un supragénero que tiene la fórmula:



20 Supragénero,

en donde R' se selecciona del grupo constituido por carbonilo, hidroxilo, OR, y OCOR, en donde R es alquilo; en donde R'' se selecciona del grupo constituido por CH(CH₃)₂, CH₂CH(CH₃)₂, y CH(CH₃)CH₂CH₃; y en donde R, T, X, y Z se seleccionan independientemente del grupo constituido por H, F, Cl, Br, I, y orbital π, con la salvedad de que si uno de R, T, X, o Z es un orbital π, entonces el R, T, X, o Z adyacente es también un orbital π, formando con ello un enlace doble.

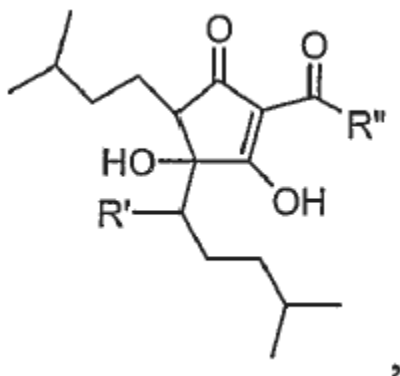
25 La expresión aislada o derivada de lúpulo puede comprender adicionalmente un compuesto del Género A que tiene la fórmula:



(Género A),

30 en donde R' se selecciona del grupo constituido por carbonilo, hidroxilo, OR, y OCOR, en donde R es alquilo; y en donde R'' se selecciona del grupo constituido por CH(CH₃)₂, CH₂CH(CH₃)₂, y CH(CH₃)CH₂CH₃.

En otra realización, la fracción aislada o derivada de lúpulo puede comprender un compuesto del Género B que tiene la fórmula:



(Género B),

- 5 en donde R' se selecciona del grupo constituido por carbonilo, hidroxilo, OR, y OCOR, en donde R es alquilo; y en donde R'' se selecciona del grupo constituido por CH(CH₃)₂, CH₂CH(CH₃)₂, y CH(CH₃)CH₂CH₃.

En una realización, la fracción aislada o derivada de lúpulo puede comprender un compuesto seleccionado del grupo constituido por, humulona, cohumulona, adhumulona, isohumulona, isocohumulona, isoadhumulona, dihidro-isohumulona, dihidro-isocohumulona, dihidro-isoadhumulona, tetrahidro-isohumulona, tetrahidro-isocohumulona, tetrahidro-isoadhumulona, hexahidro-isohumulona, hexahidro-isocohumulona y hexahidro-isoadhumulona.

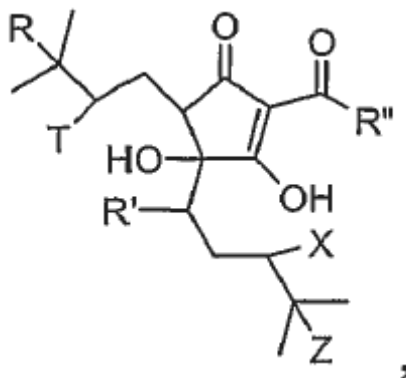
En una composición, una metilxantina puede seleccionarse de cafeína; teobromina; teofilina; aminofilina; doxofilina; pentoxifilina; 8-oxopentoxifilina; 8-oxolisofilina; lisofilina; 1-propargil-3,7-dimetil-xantina; 7-propargil-1,3-dimetil-xantina; 3-propargil-1,7-dimetil-xantina; 1,3,7-tripropargil-xantina; 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX); 1,3,7-tripropil-xantina; 7-bencil-IBMX; 1-propil-3,7-dimetil-xantina; 1,3-dipropil-7-metil-xantina; 1,3-dipropil-7-propargil-xantina; 3,7-dimetil-1-propil-xantina; 7-alil-1,3-dimetil-xantina. En una realización, la fracción aislada o derivada de lúpulo y metilxantina se encuentra en una ratio de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 1:100.

En otra realización, la fracción aislada o derivada de lúpulo es ácido isoalfa reducido y la metilxantina es cafeína.

La composición puede comprender aproximadamente 0,5 a 10.000 mg de la fracción aislada o derivada de lúpulo, o aproximadamente 50 a 7500 mg de la fracción aislada o derivada de lúpulo. Adicionalmente, la composición puede comprender aproximadamente 0,001 a 10 por ciento en peso de la fracción aislada o derivada de lúpulo. En otra realización, la composición puede comprender aproximadamente 0,1 a 1 por ciento en peso de la fracción aislada o derivada de lúpulo. Las composiciones pueden comprender adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable y se pueden formular para administración por vías oral, tópica, parenteral, o rectal.

En otra realización, se proporciona una composición que comprende una fracción derivada de lúpulo y un curcuminóide. En una composición de este tipo, la fracción derivada de lúpulo se puede seleccionar de ácidos isoalfa, ácidos isoalfa reducidos, ácidos tetrahidro-isoalfa, ácidos hexahidro-isoalfa, y ácidos beta.

En otra realización adicional de una composición de este tipo, la fracción derivada de lúpulo puede comprender un compuesto de un supragénero que tiene la fórmula:

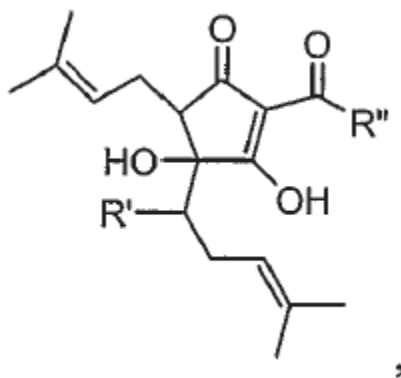


(Supragénero),

en donde R' se selecciona del grupo constituido por carbonilo, hidroxilo, OR, y OCOR, en donde R es alquilo; R'' se selecciona del grupo constituido por CH(CH₃)₂, CH₂CH(CH₃)₂, y CH(CH₃)CH₂CH₃; y en donde R, T, X, y Z se seleccionan independientemente del grupo constituido por H, F, Cl, Br, I, y orbital π, con la salvedad de que si uno de R, T, X, o Z es un orbital π, entonces el R, T, X, o Z adyacente es también un orbital π, formando con ello un enlace doble.

5

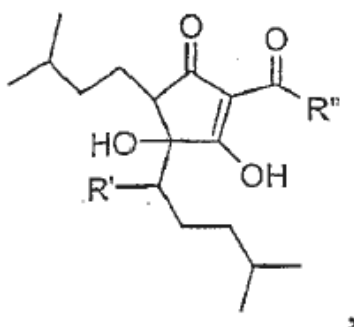
En otra realización adicional de una composición de este tipo, la fracción derivada de lúpulo comprende un compuesto del Género A que tiene la fórmula:



(Género A),

10 en donde R' se selecciona del grupo constituido por carbonilo, hidroxilo, OR, y OCOR, en donde R es alquilo; y en donde R'' se selecciona del grupo constituido por CH(CH₃)₂, CH₂CH(CH₃)₂, y CH(CH₃)CH₂CH₃.

En una realización adicional de una composición de este tipo, la fracción derivada de lúpulo puede comprender un compuesto del Género B que tiene la fórmula:



(Género B),

15

en donde R' se selecciona del grupo constituido por carbonilo, hidroxilo, OR, y OCOR, en donde R es alquilo; y en donde R'' se selecciona del grupo constituido por CH(CH₃)₂, CH₂CH(CH₃)₂, y CH(CH₃)CH₂CH₃.

En una composición de este tipo, la fracción derivada de lúpulo puede comprender un compuesto seleccionado del grupo constituido por isohumulona, isocohumulona, isoadhumulona, dihidro-isohumulona, dihidro-isocohumulona,

20 dihidro-isoadhumulona; tetrahidro-isohumulona, tetrahidro-isocohumulona, tetrahidro-isoadhumulona, hexahidro-isohumulona, hexahidro-isocohumulona, y hexahidro-isoadhumulona. En una composición de este tipo, el curcuminóide se puede seleccionar de curcumina, desmetoxicurcumina, bisdesmetoxicurcumina, cis-trans-curcumina y ciclocurcumina. En una realización, la fracción derivada de lúpulo y el curcuminóide se encuentran en una ratio de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 1:10. En otra realización, la ratio de la fracción derivada de lúpulo y el curcuminóide es aproximadamente 3:2. En una realización particular, la fracción aislada de lúpulo es ácido isoalfa reducido y el curcuminóide es curcumina.

25

Como se ha expuesto anteriormente, la composición puede comprender aproximadamente 0,5 a 10000 mg de la fracción aislada o derivada de lúpulo, o aproximadamente 50 a 7500 mg de la fracción aislada o derivada de lúpulo. Además, la composición puede comprender aproximadamente 0,001 a 10 por ciento en peso de la fracción aislada o derivada de lúpulo. En otra realización, la composición puede comprender aproximadamente 0,1 a 1 por ciento en peso de la fracción aislada o derivada de lúpulo. Las composiciones de la invención pueden comprender adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable y se pueden formular para administración por vías oral, tópica, parenteral, o rectal.

30

Se proporciona adicionalmente un método de reducción de la inflamación por administración de una composición de la invención. Un método de este tipo puede utilizarse para tratar una diversidad de condiciones inflamatorias, como se describe en esta memoria.

5 Además de ser útiles para tratamiento humano, las realizaciones de la invención son útiles también para tratamiento de otros animales, con inclusión de caballos, perros, gatos, aves, ovejas, cerdos, y análogos. Las formulaciones para el tratamiento de la inflamación pueden inhibir la inducción y actividad de COX-2 con poco efecto sobre la síntesis de PGE₂ en la mucosa gástrica. Históricamente, los NSAIDs utilizados para el tratamiento de la inflamación carecían de la especificidad de inhibición de COX-2 sin afectar a la síntesis de PGE₂ en las células de la mucosa gástrica. Por tanto, dichos fármacos irritaban y dañaban el sistema gastrointestinal cuando se utilizaban durante 10 periodos prolongados. Tales contraindicaciones no están asociadas con la presente invención y, por tanto, las formulaciones descritas pueden utilizarse durante periodos prolongados con gastropatía limitada o nula. La administración puede realizarse por cualquier método disponible para el especialista experto, por ejemplo, por vía, tópica, transdérmica, transmucosal, o parenteral.

15 Se proporciona adicionalmente un método de reducción de la inflamación por administración de un ácido isoalfa o ácido isoalfa reducido aislado de lúpulo y una metilxantina, tal como cafeína (véase Ejemplo 4). Otros derivados de lúpulo o una fracción aislada o derivada de lúpulo pueden administrarse también con una metilxantina tal como cafeína para reducir la inflamación. Las metilxantinas tales como cafeína y otros derivados de metilxantina metilados pueden sintetizarse o aislarse de fuentes naturales tales como granos de café, hojas de té, semillas de guaraná, y análogas. Guaraná (*Paullinia cupana*) es una fuente de metilxantinas múltiples, con inclusión de cafeína y teofilina.

20 Como se utiliza en esta memoria, "reducción de la inflamación" se refiere a disminución, mejora o inhibición de una respuesta inflamatoria. Un experto en la técnica puede reconocer fácilmente una reducción en un signo o síntoma asociado con una respuesta inflamatoria. La reducción de la inflamación puede referirse a disminución de la gravedad de un signo o síntoma asociado con inflamación, así como la inhibición de la inflamación de tal modo que se presenten pocos o ningún síntoma asociado con inflamación.

25 Se proporciona además un método de inhibición de la inflamación por administración de un ácido isoalfa o ácido isoalfa reducido aislada de lúpulo y un curcuminoide tal como curcumina (véase el Ejemplo 3). Otros derivados de lúpulo o una fracción aislada o derivada de lúpulo pueden administrarse también con un curcuminoide tal como curcumina a fin de reducir la inflamación.

30 Como se utilizan en esta memoria, los términos "curcuminoide" y "curcuminoide activo" se refieren a especies comprendidas dentro de los Géneros curcuminoide que es capaz de inhibir la inducibilidad y/o actividad de COX-2, en tanto que tienen poco o ningún efecto sobre COX-1 o es capaz de inhibir o reducir la gravedad de una respuesta inflamatoria. El curcuminoide puede extraerse de productos naturales o sintetizarse químicamente.

35 Una fracción pigmentada amarilla aislada de los rizomas de *Curcuma longa* contiene curcuminoideos pertenecientes al grupo del dicinamoil-metano. Los curcuminoideos están presentes en la proporción de 3 a 5%. Los mismos se consideran como los ingredientes activos más importantes y se cree que son responsables de la actividad biológica de *Curcuma longa*. Aunque su actividad principal es anti-inflamatoria, se ha informado que los curcuminoideos poseen asimismo actividad antioxidante, antialérgica, curativa de heridas, antiespasmódica, antibacteriana, antifúngica y antitumoral. La curcumina (Figura 4B) fue aislada en 1815 y definida estructuralmente en 1910. Otros curcuminoideos aislados de *Curcuma longa* incluyen desmetoxicurcumina (Figura 4C), bisdesmetoxicurcumina (Figura 4D), un isómero geométrico cis-trans de curcumina (Figura 4E), y ciclocurcumina (Figura 4F). Pueden 40 encontrarse también curcuminoideos en otras fuentes botánicas además de *Curcuma longa*, tales como *Curcuma xanthorrhiza* y *Curcuma zedoaria*.

45 Los curcuminoideos son bien conocidos por su actividad antiinflamatoria. La cúrcuma es uno de los fármacos antiinflamatorios más antiguos utilizados ya en la medicina Ayurvédica. La actividad antiinflamatoria de los curcuminoideos ha sido evaluada en modelos de reacción inflamatoria tales como irritantes químico-físicos como carragenina, pélets de algodón, formaldehído y la bolsa de granuloma. Pruebas clínicas de tipo doble ciego en humanos han demostrado eficacia en la artritis reumatoide a una dosis de 1200 mg de curcuminoideos/día durante 5 a 6 semanas. A estas dosis, sin embargo, se informan frecuentemente signos de malestar gastrointestinal (GI) e irritación del estómago. El desajuste GI y la irritación del estómago causados por dosis altas de curcuminoideos 50 pueden ser debidos al hecho de que los curcuminoideos actúan sobre la producción de prostaglandinas de una manera similar a la de la aspirina y los agentes antiinflamatorios semejantes a la aspirina.

Preferiblemente, el Género curcuminoide, como se representa en la Figura 4A, y se ilustra específicamente por la curcumina en la Figura 4B es un extracto botánico de grado farmacéutico tal como el que puede obtenerse 55 emplearse incluyen desmetoxicurcumina (Figura 4C), bisdesmetoxicurcumina (Figura 4D), una curcumina cis-trans (Figura 4E), y ciclocurcumina (Figura 4F). El curcuminoide utilizado puede obtenerse fácilmente de *Curcuma longa* L. El extracto curcuminoide de grado farmacéutico está estandarizado de modo que tenga un contenido de curcuminoideos mayor que aproximadamente 70 por ciento. El extracto farmacéutico de grado botánico puede estar ensayado respecto a seguridad y eficacia. Como se emplea en las realizaciones, el extracto tiene un contenido de

curcuminoides de aproximadamente 1 a 99 por ciento en peso. El contenido mínimo de curcuminoides es por regla general aproximadamente 70 por ciento en peso, y puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o mayor. Alternativamente, el curcuminoides puede sintetizarse utilizando técnicas estándar conocidas en síntesis química.

En una composición que contiene una fracción aislada o derivada de lúpulo, por ejemplo RIAA, IAA, TIAA o HHIAA, y un curcuminoides, la composición puede formularse para suministrar aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5.000 mg de curcuminoides por día. En particular, una dosis diaria eficaz puede formularse para suministrar aproximadamente 5 a aproximadamente 2000 mg de curcuminoides por día, por ejemplo aproximadamente 10 a aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 20 a aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 50 a aproximadamente 500 mg, o aproximadamente 100 a aproximadamente 200 mg. En una realización, la composición puede formularse para proporcionar una dosis diaria eficaz para ser administrada una sola vez o dos veces al día. En una realización, una composición puede contener aproximadamente 200 mg de un curcuminoides, y aproximadamente 300 mg de una fracción aislada o derivada de lúpulo para administración una o dos veces al día. En una realización particular, una composición puede contener aproximadamente 200 mg de un curcuminoides, y aproximadamente 300 mg de RIAA. Adicionalmente, una composición puede contener, en una realización particular, aproximadamente 200 mg de un curcuminoides y aproximadamente 300 mg de IAA. Asimismo, una composición puede contener aproximadamente 200 mg de un curcuminoides y aproximadamente 300 mg de TIAA o HHIAA.

En una composición que contiene una fracción aislada o derivada de lúpulo y una metilxantina tal como cafeína o teofilina, la composición puede formularse para suministrar aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5000 mg of una metilxantina por día. En particular, una dosis diaria eficaz puede formularse para suministrar aproximadamente 5 hasta aproximadamente 2000 mg of una metilxantina por día, por ejemplo, aproximadamente 10 hasta aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 20 hasta aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 50 hasta aproximadamente 500 mg, o aproximadamente 100 hasta aproximadamente 200 mg. Por ejemplo, la composición puede formularse para proporcionar una dosis diaria eficaz que se administra una sola vez o dos veces al día. En una realización particular, una composición puede contener aproximadamente 100 mg de metilxantina, por ejemplo, cafeína o un derivado de cafeína tal como teofilina, y 300 mg de RIAA para ser administrada una o dos veces al día.

Ensayo que Utiliza la Línea de Células AGS

El descubrimiento de COX-2 ha hecho posible el diseño de fármacos que reducen la inflamación sin eliminar las prostaglandinas (PGs) protectoras en el estómago y el riñón producidas por COX-1. Como se describe en esta memoria, las composiciones pueden evaluarse utilizando células animales *in vitro* para valorar la actividad inhibitoria de COX-2 y COX-1 empleando PGE₂, que tiene acciones citoprotectoras y juega un papel en el mantenimiento de la integridad de la mucosa gastrointestinal, como punto final. En segundo lugar, se utilizan tipos de células diferentes para confirmar los resultados. El proceso de cribado puede utilizarse para indicar composiciones que tienen actividad específica de COX-2 e inhibición limitada de COX-1. Las composiciones pueden testarse en dos tipos de células: 1) células pulmonares humanas u otra línea de células para determinar e identificar las cantidades y ratios óptimas para composiciones que comprenden más de un componente; y 2) células epiteliales gástricas humanas (línea de células AGS), una línea de células del tracto gastrointestinal y un sistema modelo para evaluación de la toxicidad que está relacionada típicamente con la inhibición de COX-1, que se requiere para curación de las heridas (tales como úlceras). Por tanto, las composiciones que pueden inhibir COX-2 o la inducción de COX-2 pueden cribarse seleccionando composiciones que tengan actividad baja o nula en las células AGS y actividad satisfactoria en las células pulmonares humanas u otras líneas de células.

Como se describe en esta memoria, están disponibles una diversidad de ensayos para mostrar la eficacia de una o más fracciones aisladas o derivadas de lúpulo (véanse los ejemplos). Los expertos en la técnica entenderán que una fracción aislada o derivada de lúpulo, como se describe en esta memoria, puede ensayarse respecto a actividad en la reducción de la inflamación utilizando una diversidad de ensayos bien conocidos por los expertos en la técnica, con inclusión de los ilustrados en esta memoria.

Los ejemplos que siguen tienen por objeto ilustrar la invención.

Ejemplo 1

LAS CÉLULAS AGS DE LA MUCOSA GÁSTRICA EXPRESAN CONSTITUTIVAMENTE TANTO CICLOOXIGENASA-1 COMO CICLOOXIGENASA-2

Sumario -Este ejemplo demuestra que la línea de células AGS de la mucosa gástrica humana, que posee expresión constitutiva de COX-1 y COX-2, es un modelo para evaluación de la toxicidad gastrointestinal de los compuestos inhibidores de las ciclooxigenasas.

El equipo utilizado en este ejemplo incluía: una balanza analítica OHAS Modelo #E01140, una vitrina de bioseguridad Forma Modelo #F1214 (Marietta, Ohio), diversas pipetas para suministrar 0,1 a 100 µL (VWR, Rochester, NY), un contador-totalizador de células manual (VWR Catalog #23609-102, Rochester, NY), una

incubadora Forma Modelo #F3210 de CO₂ (Marietta Ohio), un hemacitómetro (Hausser Modelo #1492, Horsham, PA), un microscopio invertido Leica Modelo #DM IL (Wetzlar, Alemania), un PURELAB Plus Water Polishing System (U.S. Filter, Lowell, MA), un refrigerador a 4 °C (Forma Modelo #F3775, Marietta, Ohio), un mezclador vorticial (VWR Catalog #33994-306, Rochester, NY), y un baño de agua a 37 °C (Shel Lab Modelo #1203, Cornelius, OR).

Productos químicos y reactivos -El kit de prostaglandina E2 EIA Monoclonal se adquirió de 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 anti-cabra de burro fue proporcionada por Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). El Suero Bovino Fetal desactivado por calentamiento (FBS-HI Cat. #35-011CV), y el Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM Cat #10-013CV) se adquirió de Mediatech (Herndon, VA). Todos los reactivos estándar se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO) y eran de la máxima pureza disponible comercialmente.

Cultivo de células -La línea de células AGS de la mucosa gástrica humana se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC número CRL-1739; Manassas, VA) y se subcultivó conforme a las instrucciones del suministrador. Las células se cultivaron rutinariamente a 37°C con 5% de CO₂ en RPMI1640 que contenía 10% de FCS, con 50 unidades de penicilina/mL, 50 µg estreptomycin/mL, 5% de piruvato de sodio y 5% de L-glutamina. Las células que crecían exponencialmente se sembraron en placas de 6 pocillos y se dejaron crecer hasta confluencia. Una parte alícuota de 20 µL del medio sobrenadante se muestreó para determinación del contenido de PGE₂. Las células se lavaron luego en PBS, se rascaron y se lisaron para inmunotransferencia.

Ensayo de Proteínas -Las concentraciones de proteína de los hidrolizados de células se determinaron utilizando el Kit de Cuantificación de Proteínas NanoOrange con seroalbúmina bovina como estándar (Molecular Probes, Eugene, OE) conforme al procedimiento suministrado por el fabricante. La fluorescencia se determinó utilizando un fluorómetro Packard FluoroCount, Modelo BF10.000 con el filtro de excitación ajustado a 485 nm y el filtro de emisión ajustado a 570 nm utilizando un software Packard PlateReader, versión 3.0. El programa I-Smart proporcionado con el Packard PlateReader se utilizó para calcular la concentración de proteínas.

Inmunotransferencia -Se realizó una transferencia Western de COX-1 y COX-2 utilizando PAGEr™ Gold Precast Gels (Bio Whittaker Molecular Applications (Rockland, ME). Lisados de células AGS que contenían aproximadamente 60 µg de proteína se cargaron con Tampón de Muestra Laemmli en los pocillos del gel en un volumen total de 30 µL. Las cámaras verticales de electroforesis en minigel fueron proporcionadas por Savant Instruments Inc. (Holbrook, NY), Modelo MV 120. Los geles se pasaron a 40 mA/placa (corriente constante) a la temperatura ambiente hasta que el tinte azul de bromofenol alcanzó el fondo del gel, aproximadamente en 1 hora. Los geles se transfirieron luego sobre las membranas de transferencia de poli(fluoruro de vinilo) (Pall Corporation, Ann Arbor, MI), durante una noche, a 500 mA y 4°C. Se utilizaron marcadores de peso molecular Precision Protein Standard, sin tinte y de campo ancho (BioRad, Hercules, CA). Se utilizó el sustrato quimioluminiscente de duración extendida BioWest™, un kit no isotópico de sustrato de peroxidasa de rábano picante para la detección por transferencia Western (BioImaging Systems, Upland, CA) para visualización de las proteínas. Las imágenes de las transferencias Western se adquirieron utilizando un UVP Epi Chemi II Darkroom (BioImaging Systems), se analizaron y se mejoraron por el Software de Adquisición y Análisis de Imágenes LabWorks™ (BioImaging Systems).

Ensayo de PGE₂ -Se empleó un procedimiento comercial no radiactivo para cuantificación de PGE₂ (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) y se utilizó el procedimiento recomendado por el fabricante sin modificación. Resumidamente, 25 µM del medio, junto con una dilución seriada de muestras estándar de PGE₂, se mezclaron con cantidades apropiadas de trazador marcado con acetilcolinesterasa y antisuero de PGE₂, y se incubaron a la temperatura ambiente durante 18 horas. Después de vaciar y enjuagar los pocillos con tampón de lavado, se añadieron 200 µL de reactivo de Ellman que contenía sustrato para acetilcolinesterasa. La reacción se llevó a cabo en una máquina de sacudidas lenta a la temperatura ambiente durante 1 hora y se determinó la absorbancia a 415 nm. La concentración de PGE₂ se representó como picogramos por 10⁵ células.

Resultados -La línea de células AGS expresa constitutivamente tanto COX-1 como COX-2 con expresión de COX-1 aproximadamente 4 veces mayor que la expresión de COX-2. La síntesis de PGE₂ en las células AGS durante 18 horas era 660 pg/10⁵ células. Así pues, este ejemplo demuestra que la línea de células AGS de la mucosa gástrica humana, que posee expresión constitutiva de COX-1 y COX-2, puede servir como modelo para evaluar la toxicidad gastrointestinal de los compuestos inhibidores de las ciclooxigenasas.

En el pasado, la hipótesis clásica de COX-2 ha restado importancia al papel de expresión de COX-2 en la mucosa gastrointestinal. Si bien en la mucosa gástrica normal COX-1 es la isoforma COX predominante, como se demuestra en este ejemplo y en la bibliografía, existen pruebas crecientes de que cantidades detectables de mRNA y proteína COX-2 se expresan ambas constitutivamente y son inducibles en localizaciones específicas de la mucosa gástrica tanto en animales como en humanos (Halter et al. Gut 49: 443-453 (2001)). Estudios recientes en ratas han demostrado que aun cuando la inhibición selectiva de COX-1 o COX-2 no es ulcerogénica, la inhibición combinada a la vez de COX-1 y COX-2 induce lesiones graves en el estómago y el intestino delgado comparables a los efectos de NSAID tales como indometacina. Esta observación sugiere una contribución importante de COX-2 al mantenimiento de la integridad de la mucosa gastrointestinal.

Ejemplo 2

Inhibición de la síntesis de pge₂ en macrófagos murinos estimulados y no estimulados por los compuestos y derivados de lúpulo (*Humulus lupulus*)

5 Sumario -Este ejemplo ilustra que fracciones y derivados de lúpulo inhiben la síntesis de PGE₂ de COX-2 con preferencia a la síntesis de PGE₂ por COX-1 en el modelo de macrófagos de murino RAW 264.7.

10 *Productos químicos y reactivos* -El lipopolisacárido bacteriano (LPS; B E. coli 055:B5) era de Sigma (St. Louis, MO). Las fracciones de lúpulo (1) en alfahop (1% ácidos alfa; AA), (2) aromahop OE (10% ácidos beta y 2% ácidos alfa isomerizados), (3) isohop (ácidos alfa isomerizados; IAA), (4) solución de ácidos beta (ácidos beta BA), (5) hexahop oro (ácidos alfa hexahidro isomerizados; HHIAA), (6) redihop (ácidos alfa isomerizados reducidos; RMIAA), (7) tetrahop (ácidos tetrahidro-iso-alfa TIAA) y (8) lúpulo agotado se obtuvieron de BetaTech Hops Products (Washington, D.C., Estados Unidos). El lúpulo agotado se extrajo dos veces con volúmenes iguales de etanol absoluto. El etanol se eliminó por calentamiento a 40°C hasta que quedaba solamente un residuo pardo denso. Este residuo se disolvió en DMSO para ensayos en células RAW 264.7. A no ser que se indique otra cosa, todos los reactivos estándar se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO) y eran de la pureza máxima disponible comercialmente. 15 Todos los productos químicos y equipos restantes eran como se describe en el EJEMPLO 1.

20 *Cultivo de células* -Las células RAW 264.7, obtenidas de American Type Culture Collection (Catálogo #TIB-71, Manassas, VA) se dejaron crecer en la Modificación por Dulbecco de Medio Eagle (DMEM, Mediatech, Herndon, VA) y se mantuvieron en fase logarítmica. El medio de crecimiento DMEM se preparó por adición de 50 mL de FBS desactivado por calentamiento y 5 mL de penicilina/estreptomicina a una botella de 500 mL de DMEM y mantenimiento a 4°C. El medio de crecimiento se calentó a 37°C en un baño de agua antes de su utilización.

El día uno del experimento, las células RAW 264.7 en fase logarítmica se extendieron en placas a razón de 8 x 10⁴ células por pocillo en 0,2 mL de medio de crecimiento por pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos durante la mañana. Al final del día uno (6 a 8 horas después de la extensión en placas), se retiraron 100 µL de medio de crecimiento de cada pocillo y se reemplazaron con 100 µL de medio fresco.

25 Se preparó una solución stock de 1,0 mg/mL de LPS, utilizado para inducir la expresión de COX-2 en las células RAW 264.7 por disolución de 1,0 mg de LPS en 1 mL de DMSO. Se agitó la misma vorticialmente hasta que se disolvió y se guardó a 4°C. Antes de su utilización, se fundió a la temperatura ambiente o en un baño de agua a 37°C.

30 El día dos del experimento, se prepararon los materiales de ensayo como stock 1000 X en DMSO. En tubos de microcentrífuga de 1,7 mL, se añadió 1 mL de DMEM sin FBS para concentraciones de ensayo de 0,05, 0,10, 0,5, y 1,0 µg/mL. Se añadieron 2 µL del stock de DMSO 1000X del material de ensayo al 1 mL de medio sin FBS. El tubo contenía la concentración final de material de ensayo concentrado 2 veces y se puso en una incubadora durante 10 minutos hasta alcanzar el equilibrio a 37°C.

35 Para la síntesis de PGE₂ asociada a COX-2, se retiraron 100 µL de medio de cada pocillo de las placas de células preparadas el día uno y se reemplazaron con 100 µL de concentración final 2X equilibrada de los compuestos de ensayo. Las células se incubaron luego durante 90 minutos. Se añadieron 20 µL de LPS a cada pocillo de células a estimular a fin de 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 la viabilidad celular por un ensayo colorimétrico basado en bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma, St. Louis, MO). La solución de MTT se añadió directamente a los pocillos después de la toma de muestras para determinación de PGE₂. La absorbancia de cada pocillo se leyó a 580 nm utilizando un lector de placas ELISA. No se observó toxicidad alguna a las concentraciones máximas testadas para ninguno de los compuestos. Se transfirieron 25 µL de medio sobrenadante de cada pocillo a un tubo de microcentrífuga limpio para la determinación de la PGE₂ liberada en el medio. Se ensayó PGE₂ y se comunicó como se ha descrito previamente en el EJEMPLO 1. 40

45 Para la síntesis de PGE₂ asociada a COX-1, se retiraron 100 µL de medio de cada pocillo de las placas de células preparadas el día uno y se reemplazaron con 100 µL de concentración final 2X equilibrada de los compuestos de ensayo. Las células se incubaron luego durante 90 minutos. A continuación, en lugar de la estimulación con LPS, las células se incubaron con ácido araquidónico 100 µM durante 15 minutos. Se transfirieron 25 µL de medio sobrenadante de cada pocillo a un tubo limpio de microcentrífuga para determinación de la PGE₂ liberada en el medio. Se observó el aspecto de las células y se determinó la viabilidad como se ha descrito arriba. No se observó toxicidad alguna a las concentraciones máximas testadas para ninguno de los compuestos. Se transfirieron 25 µL de medio sobrenadante de cada pocillo a un tubo limpio de microcentrífuga para determinación de la PGE₂ liberada en el medio. Se determinó la PGE₂ y se comunicó como se ha descrito previamente en el EJEMPLO 1. Las concentraciones inhibitoras medianas (CI₅₀) para la síntesis de PGE₂ por ambas COX-2 y COX-1 se calcularon como se describe a continuación. 50 55

La concentración inhibitora mediana (CI₅₀) para la síntesis de PGE₂ se calculó utilizando CalcuSyn (BIOSOFT, Ferguson, MO). Este paquete estadístico realiza cálculos múltiples dosis-efecto de fármaco utilizando los métodos

de efecto mediano descritos por Chou y Talalay, Adv. Enzyme Regul. 22:27-55 (1984), que se incorpora en esta memoria por referencia.

Resumidamente, el análisis correlaciona la "Dosis" y el "Efecto" en la forma más simple posible: $fa/fu = (C/C_m)^m$, donde C es la concentración o dosis del compuesto y C_m es la dosis efectiva mediana que significa la potencia. C_m se determina a partir de la intersección con el eje X de la gráfica mediana-efecto. La fracción afectada por la concentración del material de ensayo es fa y la fracción no afectada por la concentración es ($fu=1-fa$). El exponente m es el parámetro que significa la sigmoidicidad o forma de la curva dosis-efecto. El mismo se estima por la pendiente de la gráfica mediana-efecto.

La gráfica mediana-efecto es una gráfica de $x = \log(C)$ frente a $y = \log(fa/fu)$ y está basada en la forma logarítmica de la ecuación mediana-efecto de Chou. La bondad del ajuste de los datos a la ecuación mediana-efecto se representa por el coeficiente de correlación lineal r de la gráfica mediana-efecto. Usualmente, los datos experimentales de los sistemas de enzimas o receptores tienen un valor $r > 0,96$, los de cultivo de tejidos un $r > 0,90$ y los de sistemas animales un $r > 0,85$. En los estudios basados en células aquí consignados, todos los coeficientes de correlación lineal eran mayores que 0,90. Los experimentos se repitieron 3 veces en 3 fechas diferentes. La inhibición porcentual para cada dosis se promedió para los 3 experimentos independientes y se utilizó para calcular las concentraciones inhibitoras medianas consignadas.

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

Material de ensayo	COX-2 CI_{50} [μ g/mL]	COX-1 CI_{50} [μ g/mL]	COX-1 $CI_{50}/COX-2$ CI_{50}
Estructuras del Género A			
Isohop (IAA)	0,13	18	144
Redihop (RIAA)	0,34	29	87
Estructuras del Género B			
Tetrahop (THIAA)	0,20	4,0	21
Hexahop (HHIAA)	0,29	3,0	11
Ácidos alfa			
Alfahop (AA)	0,21	6,2	30
Otros			
Aromahop OE	1,6	4,1	2,6
Ácidos beta (BA)	0,54	29	54
Lúpulo agotado (EtOH)	0,88	21	24

Como se ve en la Tabla 3, todas las fracciones de lúpulo y derivados inhibían selectivamente COX-2 sobre COX-1 en este modelo de macrófagos diana. Esto era un descubrimiento nuevo e inesperado. La extensión de la selectividad de COX-2 para los derivados de lúpulo IAA y RIAA, 144 y 87 veces respectivamente, era imprevista. En este modelo de células RAW 264.7, los compuestos del Género A exhibían una selectividad para COX-2 mayor que los compuestos del Género B, promediando una inhibición de COX-2 116 veces frente a 16 veces mayor, respectivamente. Los ácidos alfa, los ácidos beta y el lúpulo agotado eran también inhibidores muy selectivos de COX-2, con ratios COX-1/COX-2, respectivamente, 30, 54 y 24. Dicha alta selectividad para COX-2 combinada con concentraciones inhibitoras medianas bajas, no ha sido consignada con anterioridad para productos naturales de otras procedencias. Aromahop era el menos selectivo para COX-2, con una ratio COX-1/COX-2 de 2,6.

Ejemplo 3

Sinergia de la inhibición de pge_2 producida por combinaciones de ácidos alfa isomerizados reducidos y extracto de curcumina en las células endoteliales aórticas humanas (no forma parte de la invención)

Sumario -Este ejemplo describe el efecto de combinaciones de ácidos alfa isomerizados reducidos (RIAA) y curcumina sobre la inhibición de la producción de prostaglandina E_2 (PGE_2) en el modelo de inflamación de las células endoteliales aórticas humanas estimuladas con el factor de necrosis tumoral A (TNF-alfa).

El equipo estándar utilizado en estos experimentos se describe en el Ejemplo 1. Los productos químicos y reactivos se obtuvieron como sigue. TNF-alfa era de Sigma (St. Louis, MO). El kit del anticuerpo monoclonal de prostaglandina E_2 se adquirió de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). El Suero Bovino Fetal desactivado por calentamiento (FBS-HI Cat. #35-011CV) y la Modificación de Dulbecco del medio de Eagle (DMEM, Cat #10-1013CV) se adquirió 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 de la pureza máxima disponible comercialmente. Las sustancias de ensayo incluido RIAA se obtuvieron de Betatech Hops Products (Redihop (ácidos rho-isoalfa (RIAA), 29,5-30,5%, < 0,2% ácidos iso-alfa)) (Washington, DC) y extracto de curcumina (06656) (Metagenics, Gig Harbor, WA). Otras fuentes comerciales de curcumina incluyen Nutriscience Innovations (Fairfield, CT).

- 5 *Cultivo de células y tratamiento con material de ensayo* - Las células endoteliales aórticas humanas (HAEC) se obtuvieron de Cambrex (Catal. #CC-2525, Walkersville, MD) y se subcultivaron conforme a las instrucciones del suministrador. Para los experimentos, las células HAEC se cultivan en un matraz T75 que contiene medio de crecimiento EGM-2 (Cambrex #cc-4176; que contiene Suero Bovino Fetal (FBS), hidrocortisona, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, ácido ascórbico, hEGF, GA-1000 (gentamicina/anfotericina B) y heparina) a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% aire/5% CO₂. Antes que las células llegaran a la confluencia, se prepararon para el ensayo en placas de microtitulación por tratamiento con una solución fresca de tripsina y se contaron. Aproximadamente 10⁵ células/pocillo se distribuyeron alícuotamente en placas de 96 pocillos en 200 µL de medio de crecimiento EGM-2 por pocillo. Se dejó que las células alcanzaran 80% de la confluencia antes de tratamiento con el material de ensayo y TNF-alfa.

- 15 El día del experimento, el medio de cultivo EGM-2 se aspiró y se reemplazó con 200 µL de EGM-2 que contenía el material de ensayo. El medio de crecimiento EGM-2 que contenía el material de ensayo se formuló por adición de 4 µL de material de ensayo stock 250 X en dimetilsulfóxido (DMSO) a 1 mL de EGM-2. De este modo, cada pocillo contenía la misma cantidad de DMSO. Los pocillos de control recibieron DMSO en medio de cultivo exclusivamente. Las concentraciones finales del material de ensayo eran 5, 1, 0,1 y 0,01 µg/mL. El material de ensayo se añadió antes de estimulación con 100 ng/mL de TNF-alfa.

- 20 La Tabla 4 muestra una matriz de dosificación para HAEC tratadas con material de ensayo seguido por estimulación con TNF-alfa.

Tabla 4. Matriz de dosificación para HAEC tratadas con material de ensayo seguido por estimulación con TNF-alfa.

Compuesto	Fracción RIAA	d1 [µg/mL]	d2 [µg/mL]	d3 [µg/mL]	d4 [µg/mL]	No. pocillos
1. BetaTech RIAA	1,00	5,000	1,000	0,100	0,010	8
2. Curcumina (06656)	0,00	5,000	1,000	0,100	0,010	8
3. RIAA:Curcumina [100:1]	0,99	5,000	1,000	0,100	0,010	8
	RIA =	4,950	0,990	0,099	0,0099	
	Curcumina =	0,050	0,010	0,001	0,0001	
4. RIAA :Curcumina [10:1]	0,91	5,000	1,000	0,100	0,010	8
	RIA =	4,545	0,909	0,091	0,009	
	Curcumina =	0,455	0,091	0,009	0,001	
5. RIAA:Curcumina [3:1]	0,75	5,000	1,000	0,100	0,010	8
	RIA =	3,750	0,750	0,075	0,0075	
	Curcumina =	1,250	0,250	0,025	0,0025	
6. RIAA:Curcumina [3:2]	0,60	5,000	1,000	0,100	0,010	8
	RIA =	3,00	0,60	0,06	0,006	
	Curcumina =	2,00	0,40	0,04	0,004	
7. RIAA:Curcumina [1:1]	0,50	5,000	1,000	0,100	0,010	8
	RIA =	2,50	0,50	0,05	0,005	
	Curcumina =	2,50	0,50	0,05	0,005	
B. RIAA:Curcumina [2:3]	0,40	5,000	1,000	0,100	0,010	8
	RIA =	2,00	0,40	0,04	0,00	
	Curcumina =	3,00	0,60	0,06	0,01	
9. RIAA:Curcumina [1:10]	0,09	5,000	1,000	0,100	0,010	8
	RIA =	0,455	0,091	0,009	0,001	
	Curcumina =	4,545	0,909	0,091	0,009'	
10. RIAA:Curcumina [1:100]	0,010	5,000	1,000	0,100	0,010	e
	RIA =	0,05	0,01	0,001	0,0001	
	Curcumina =	4,95	0,99	0,099	0,0099	

Experimentos en los que el control positivo para tratamiento con TNF-alfa de HAEC no estimulaba las células se excluyeron.

5 *Determinación de PGE₂* -Se empleó un procedimiento comercial no radiactivo para cuantificación de PGE₂ (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) para la determinación de PGE₂, y se utilizó el procedimiento recomendado por el fabricante sin modificación. Resumidamente, se diluyeron 50 µL del medio de cultivo sobrenadante con las cantidades apropiadas de trazador marcado con acetilcolinesterasa y antisuero PGE₂ y se incubaron a la temperatura ambiente durante 18 horas. Después de ello, los pocillos en la placa de microtitulación del ensayo de PGE₂ se vaciaron y se enjuagaron con tampón de lavado; se añadieron luego 200 µL de reactivo de Ellman que contenía sustrato para
10 acetilcolinesterasa. La reacción se mantuvo en una máquina de sacudidas lenta a la temperatura ambiente durante 1 hora y se determinó la absorbancia a 415 nm en un lector de placas de ensayo de monosorbente unido a enzima (ELISA) de Bio-tek Instruments (Modelo #E1x800, Winooski, VT). Las especificaciones del fabricante para este ensayo incluyen un coeficiente de variación intra-ensayo de <10%, reactividad cruzada con PGD₂ y PGF₂α menor que 1% y linealidad a lo largo del intervalo de 10-1000 pg mL⁻¹. La concentración de PGE₂ se computó como pg
15 PGE₂ por 10⁵ células, como se describe más adelante.

Para cálculos relacionados con los ensayos PGE₂, la concentración inhibidora mediana (CI₅₀) para la síntesis de PGE₂ se calculó utilizando CalcuSyn (BIOSOFT, Ferguson, MO). Este paquete estadístico realiza cálculos múltiples dosis/efecto de fármaco utilizando los métodos de efecto mediano descritos por Chou y Talalay (Adv. Enzyme Regul. 22, 27-55 (1984)).

20 Resumidamente, el análisis correlaciona la "Dosis" y el "Efecto" en la forma más simple posible: $fa/fu = (C/C_m)^m$, donde C es la concentración o dosis del compuesto y C_m es la dosis efectiva mediana que significa la potencia. C^m se determina a partir de la intersección con el eje X de la gráfica mediana-efecto. La fracción afectada por la concentración del material de ensayo es fa y la fracción no afectada por la concentración es (fu=1-fa). El exponente m es el parámetro que significa la sigmoidicidad o forma de la curva dosis-efecto. El mismo se estima por la
25 pendiente de la gráfica mediana-efecto.

La gráfica mediana-efecto es un gráfico de $x = \log(C)$ frente a $y = \log(fa/fu)$ y está basada en la forma logarítmica de la ecuación mediana-efecto de Chou. La bondad del ajuste de los datos a la ecuación mediana-efecto se representa por el coeficiente de correlación lineal r de la gráfica mediana-efecto. Usualmente, los datos experimentales de los sistemas de enzimas o receptores tienen un valor $r > 0,96$, los de cultivo de tejidos un $r > 0,90$ y los de sistemas
30 animales un $r > 0,85$. En los estudios basados en células aquí consignados, todos los coeficientes de correlación lineal eran mayores que 0,90. Para resultados más consistentes, los experimentos se repitieron un mínimo de 3 veces en 3 fechas diferentes. La inhibición porcentual para cada dosis se promedia para los 3 experimentos independientes y se utiliza para calcular las concentraciones inhibidoras medianas consignadas.

La sinergia de los componentes de ensayo se cuantificó utilizando el parámetro índice de combinación (CI). El CI de Chou-Talalay está basado en la ratio fármaco-efecto múltiple y se deriva de modelos cinéticos de enzimas (Chou y Talalay, J. Biol. Chem. 252: 6438-6442 (1977)). La ecuación determina únicamente el efecto aditivo en lugar de sinergia o antagonismo. La sinergia se define en esta memoria como un efecto mayor que el efecto aditivo esperado, y el antagonismo como un efecto menor que el aditivo esperado, como fue propuesto por Chou y Talalay, *supra*,
35 1977. Utilizando la designación de CI = 1 como el efecto aditivo, para compuestos mutuamente excluyentes que tienen el mismo modo de acción o para fármacos no excluyentes mutuamente que tienen modos de acción totalmente independientes, se obtienen las relaciones siguientes: $CI < 1$, = 1, y > 1 indicando respectivamente sinergia, aditividad y antagonismo, respectivamente.

45 *Viabilidad celular* - La viabilidad celular se evaluó por inspección visual de las células antes de o inmediatamente después de la toma de muestras del medio para ensayo de PGE₂. La mortalidad celular se anotó en caso de observarse.

Para métodos estadísticos, se utilizó un mínimo de cuatro concentraciones (Tabla 4) a fin de computar las curvas dosis-respuesta y las concentraciones inhibidoras medias (CI₅₀s) con intervalos de confianza de 95% utilizando CalcuSyn (BIOSOFT, Ferguson, MO). Este paquete estadístico realiza cálculos múltiples dosis-efecto de fármaco utilizando los métodos de efecto mediano descritos por Chou y Talalay (*supra*, 1984). Todos los datos dosis-respuesta capturaban la concentración inhibidora mediana. Se aplicaron dos transformaciones de datos en caso
50 justificado. La primera transformación consistía en computar el porcentaje de inhibición de la producción máxima de PGE₂ producida por la concentración de ensayo mínima cuando la producción de PGE₂ de estas dosis bajas excedía de la producción de PGE₂ del control estimulado con TNF-alfa. Este proceso controla la variabilidad de la respuesta y los gradientes a lo largo de la placa. La segunda transformación de datos se ajustó por la varianza en respuesta a las dosis clasificadas. Las simulaciones Monte Carlo utilizando la varianza histórica entre pocillos predecían que las curvas dosis-respuesta parecen clasificadas sólo 40% del tiempo cuando se utilizan pocillos duplicados por
55 concentración en una curva dosis-respuesta de cuatro puntos. Así, la clasificación de la respuesta por concentración antes de calcular el valor CI₅₀ se realizó en aquellas situaciones en las cuales la respuesta no parecía estar clasificada.

Resultados -El valor CI_{50} de 0,81 $\mu\text{g/mL}$ (límite de confianza (CL) de 95% 0,19-3,4 $\mu\text{g/mL}$) obtenido para RIAA en este estudio era consistente con resultados previos para RIAA utilizando otros modelos de inflamación tales como el modelo LPS-RAW 264.7. La curcumina exhibía una concentración inhibitoria mediana de 1,4 $\mu\text{g/mL}$ (CL 95% 0,75-2,7), consistente con los valores consignados en la bibliografía para una diversidad de valores de inflamación.

5 Ejemplos de concentraciones inhibitorias medianas consignadas para curcumina incluyen 1,8 a 3,6 $\mu\text{g/mL}$ (5 a 10 μM) para inhibición de la actividad de ciclooxigenasa inducida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) en la epidermis de ratón (Huang et al., Cancer Res. 51:813-819 (1991)); 63% de inhibición en curcumina 5 μM de la biosíntesis de PGE₂ mediada por ciclooxigenasa-2 (COX-2) inducida por forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) en células epiteliales gastrointestinales humanas (Zhang et al., F., Carcinogenesis 20: 445-451 (1999)); e inhibición de

10 aproximadamente 80% de la expresión de la proteína COX-2 a 3,6 $\mu\text{g/mL}$ en células de cáncer de colon humanas HT-29 sin tratar (Goel et al., Cancer Letters 172:111.118 (2001)).

Estudios de inhibición directa de las isozimas COX-1 y COX-2 indican valores CI_{50} bastante altos para inhibición de PGE₂, y selectividad baja de COX-2, respectivamente, aproximadamente 70 $\mu\text{g/mL}$ y 2,1 veces (Ramsewak et al., Phytomedicine 7: 303-308 (2000)).

15 Las concentraciones inhibitorias medianas para RIAA, curcumina y combinaciones RIAA-curcumina para HAEC estimuladas con TNF-alfa se presentan en la Tabla 5, computándose las regiones de sinergia para cada combinación. Se observó sinergia para todas las combinaciones RIAA:curcumina, aunque en segmentos diferentes de las curvas dosis-respuesta. Se observaron regiones de sinergia en ambos extremos bajo y alto de la curva dosis-respuesta y con combinaciones en las cuales RIAA > curcumina y también cuando RIAA < curcumina (por ejemplo,

20 RIAA:curcumina 100:1 a 1:100). Así pues, es razonable esperar que ocurra sinergia *in vivo* a lo largo de un amplio intervalo de dosis tanto de RIAA como de curcumina con indiferencia de la ratio de los componentes en la formulación dosificada.

Tabla 5. Concentraciones inhibitorias medianas y regiones de sinergia para RIAA, curcumina y combinaciones RIAA:curcumina en HAEC estimuladas con TNF-alfa.

Material de Ensayo	RIAA [%]	CI_{50} [$\mu\text{g/mL}$]	Región de Sinergia RIAA [$\mu\text{g/mL}$]
RIAA	100	0,81	
Curcumina	0	1,4	
RIAA:Curcumina [100:1]	99	1,6	4,6 - 495
RIAA:Curcumina [10:1]	91	2,4	30 - 2266
RIAA:Curcumina [3:1]	75	1,3	0,000001 - 0,17
RIAA:Curcumina [3:2]	60	1,1	0,000004 - 0,36
RIAA:Curcumina [1:1]	50	1,7	0,00004 - 0,052
RIAA:Curcumina [2:3]	40	4,6	0,000026 - 0,013
RIAA:Curcumina [1:10]	9,1	2,9	0,000037 - 0,0018
RIAA:Curcumina [1:100]	1,0	2,0	0,0000082 - 0,000055

25

Región de sinergia definida por $CI < 1,0$

Las HAEC se trataron con material de ensayo 60 minutos antes de la estimulación con TNF-alfa y se incubaron durante una noche. Dieciocho horas después de la estimulación con TNF-alfa, se muestreó el medio sobrenadante para la determinación de PGE₂. Las concentraciones inhibitorias medianas se computaron a partir de un mínimo de

30 cuatro concentraciones a lo largo de 3 experimentos independientes. Los valores CI s se computaron como se ha descrito arriba.

La Figura 6 muestra una representación gráfica del parámetro computado Índice de Combinación frente a la concentración de ácidos alfa isomerizados reducidos (RIAA) para ratios RIAA:curcumina de 100:1 (Figura 6A), 10:1 (Figura 6B), 3:1 (Figura 6C), 3:2 (Figura 6D), 1:1 (Figura 6E), 2:3 (Figura 6F), 1:10 (Figura 6G) y 1:100 (Figura 6H).

35 Estos resultados demuestran que RIAA y el extracto de curcumina son inhibidores potentes de la biosíntesis de PGE₂ en HAEC estimuladas por TNF-alfa. Se observó sinergia entre RIAA y curcumina para inhibición de la biosíntesis de PGE₂ a ratios 100:1, 10:1, y 3:2 de RIAA:curcumina. Para las combinaciones 100:1 y 10:1, esta sinergia ocurría en el extremo superior de la curva dosis-respuesta y representaba concentraciones de RIAA mayores que 3,4 y 30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Se observó una sinergia particularmente eficaz para la ratio 3:2 de RIAA:curcumina, donde CI era menor que 1 para concentraciones de RIAA menores que 0,36 $\mu\text{g/mL}$. Se observó

40 antagonismo más frecuentemente que sinergia para las combinaciones RIAA:curcumina ensayadas. El antagonismo

más pronunciado se observó para 40% RIAA con un aumento significativo en CI_{50} hasta 4,6 $\mu\text{g/mL}$, y un CI medio para los valores CI_{50} , CI_{75} y CI_{90} de 15.

Ejemplo 4

5 Sinergia de la inhibición de pge_2 producida por combinaciones de ácidos alfa isomerizados reducidos y cafeína en las células RAW 264.7

Este ejemplo describe el efecto de combinaciones de RIAA y cafeína sobre la inhibición de la producción de PGE_2 en el modelo de inflamación de células RAW 264.7 estimuladas por lipopolisacárido (LPS).

10 El equipo estándar utilizado en estos experimentos se describe en el Ejemplo 1. Los productos químicos y reactivos se obtuvieron como sigue. El lipopolisacárido bacteriano (LPS); *B. E. coli* 0,55:B5) era de Sigma (St. Louis, MO). El kit de anticuerpo monoclonal de prostaglandina E2 se adquirió de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). El Suero Bovino Fetal desactivado por calentamiento (FBS-HI Cat. #35-011CV) y la Modificación de Dulbecco del medio de Eagle (DMEM 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 de la pureza máxima disponible comercialmente. Las sustancias de ensayo incluían RIAA obtenidos de BetaTech Hops Products (Redihop ácidos rho-iso-alfa (RIAA), 29,5-30,5%, < 0,2% de ácidos iso-alfa (Washington, DC), y cafeína (Sigma, St. Louis, MO).

15 *Cultivo de células y tratamiento con material de ensayo* -Las células RAW 264.7 (ATCC número TIB-71) se obtuvieron de American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se subcultivaron conforme a las instrucciones del suministrador. En la preparación para los ensayos, las células se cultivaron en medio de cultivo DMEM con 10% FBS-HI con penicilina/estreptomicina y se mantuvieron en fase logarítmica antes del montaje experimental. El día 2 del experimento, las células se extendieron en placas a razón de 8×10^4 células por pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos con 200 μL de medio de cultivo por pocillo.

20 Después de incubación durante una noche a 37°C con 5% de CO_2 , el medio de cultivo se aspiró y se reemplazó con 200 μL de DMEM sin cantidad alguna de FBS o penicilina/estreptomicina. Los materiales de ensayo se disolvieron en DMSO como una solución stock de 250 veces. Se añadieron 4 μL de este material de ensayo stock de 250 veces a 1 mL de DMEM y se añadieron 200 μL de esta solución a pocillos por duplicado para cada dosis de material de ensayo. Las concentraciones finales de material de ensayo eran 10, 1, 0,1 y 0,01 $\mu\text{g/mL}$. Se añadió LPS para estimular la expresión de COX-2 a una concentración de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ 60 minutos después de la adición de los materiales de ensayo. La Tabla 6 muestra la matriz de dosificación para las células RAW 264.7 tratadas con material de ensayo y estimulación con LPS. Los datos de los experimentos en los cuales la estimulación con LPS era ineficaz o en los cuales los resultados de RIAA eran significativamente diferentes de los valores históricos se excluyeron de la determinación de las concentraciones inhibitoras medianas y la sinergia RIAA:cafeína.

Tabla 6. Matriz de dosificación para las células RAW 264.7 tratadas con material de ensayo y estimulación con LPS

Compuesto	Fracción RIAA	d1 [$\mu\text{g/mL}$]	d2 [$\mu\text{g/mL}$]	d3 [$\mu\text{g/mL}$]	d4 [$\mu\text{g/mL}$]	No. Pocillos
1. BetaTech RIAA	1,00	10,000	1,000	0,100	0,010	6
2. Cafeína	0,00	50,000	5,000	1,000	0,100	6
3. RIAA:Cafeína (100:1)	0,99	10,000	1,000	0,100	0,010	6
	RIAA =	9,901	0,990	0,099	0,0099	
	Cafeína =	0,099	0,010	0,001	0,0001	
4. RIAA:Cafeína (10:1)	0,91	10,000	1,000	0,100	0,010	6
	RIAA =	9,091	0,909	0,091	0,009	
	Cafeína =	0,909	0,091	0,009	0,001	
5. RIAA:Cafeína [3:1]	0,75	10,000	1,000	0,100	0,010	8
	RIAA =	7,500	0,750	0,075	0,0075	
	Cafeína =	2,500	0,250	0,025	0,0025	
6. RIAA:Cafeína [3:2]	0,60	10,000	1,009	0,100	0,010	8
	RIAA =	6,00	0,60	0,06	0,006	
	Cafeína =	4,00	0,40	0,04	0,004	
7. RIAA:Cafeína [1:1]	0,50	10,000	1,000	0,100	0,010	6
	RIAA =	5,00	0,50	0,05	0,005	
	Cafeína =	5,00	0,50	0,05	0,005	
6. RIAA:Cafeína [2:3]	0,40	10,000	1,000	0,100	0,010	6
	RIAA =	4,00	0,40	0,04	0,00	
	Cafeína =	6,00	0,60	0,06	0,01	
9. RIAA:Cafeína [1:10]	0,09	10,000	1,000	0,100	0,010	6
	RIAA =	0,909	0,091	0,009	0,001	
	Cafeína =	9,091	0,909	0,091	0,009	

ES 2 534 593 T3

10. RIAA:Cafeína [1:100]	0,010	10,000	1,000	0,100	0,010	8
	RIAA =	0,10	0,01	0,001	0,0001	
	Cafeína =	9,90	0,99	0,099	0,0099	

Los ensayos para PGE₂ se realizaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 3.

Viabilidad celular -La viabilidad celular se evaluó por inspección visual de las células antes o inmediatamente después del muestreo del medio para el ensayo de PGE₂. Se indicó la mortalidad cuando se observó.

- 5 Los métodos estadísticos se realizaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 3, excepto que la primera transformación consistía en computar el porcentaje de inhibición de la producción máxima de PGE₂ producida a partir de la concentración de ensayo mínima cuando la producción de PGE₂ de estas dosis bajas excedía de la generación de PGE₂ del control estimulado con LPS.

- 10 Resultados -El valor CI₅₀ de 1,3 µg/mL (límite de confianza (CL) de 95% 0,41-3,9 µg/mL) obtenido para RIAA en este estudio era consistente con resultados previos para RIAA en este laboratorio utilizando el protocolo LPS-RAW 264.7 durante una noche. La concentración inhibidora mediana de PGE₂ para cafeína de 25 µg/mL (CL 95% 4,6-138) en este estudio era consistente con el valor de 8,2 µg/mL designado recientemente en la bibliografía (Fiebich et al., *Neuropharmacology* 39: 2205-2213 (2000)). Los valores (CI₅₀ y CI para RIAA, cafeína y combinaciones RIAA:cafeína se presentan en la Tabla 7.

- 15 Las concentraciones inhibidoras medianas para RIAA, cafeína y combinaciones RIAA:cafeína para las células RAW 264.7 estimuladas con LPS se presentan en la Tabla 7, computándose las regiones de sinergia para cada combinación. Se observó sinergia para todas las combinaciones RIAA:cafeína, aunque en diferentes segmentos de las curvas dosis-respuesta. Se observaron regiones de sinergia en la porción superior de las curvas dosis-respuesta para combinaciones RIAA:cafeína de 100:1 a 3:2 y a lo largo de toda la curva dosis-respuesta para combinaciones de 1:1 y mayores. Por tanto, es razonable esperar que ocurra sinergia *in vivo* a lo largo de una amplia gama de dosis tanto de RIAA como de cafeína con indiferencia de la ratio de los componentes en la formulación dosificada.

Tabla 7. Concentraciones inhibidoras medianas y regiones de sinergia para RIAA, cafeína y combinaciones RIAA:cafeína en células RAW 264.7 estimuladas con LPS.

Material de Ensayo	RIAA [%]	CI ₅₀ [µg/mL]	Región de Sinergia RIAA [µg/mL]
RIAA	100	1,3	
Cafeína	0	25	
RIAA:Cafeína [100:1]	99	2,3	3,1 – 1360
RIAA:Cafeína [10:1]	91	3,1	697 – 2,4 x 10 ⁸
RIAA:Cafeína [3:1]	75	1,8	2,7 – 1,6 x 10 ⁷
RIAA:Cafeína [3:2]	60	1,9	1,1 – 251
RIAA:Cafeína [1:1]	50	0,91	3,8 x 10 ⁻⁹ – 5,8 x 10 ⁵
RIAA:Cafeína [2:3]	40	1	1,5 x 10 ⁻¹¹ – 18
RIAA:Cafeína [1:10]	9,1	1,2	2,1 x 10 ⁻⁸ – 94 x 10 ⁷
RIAA:Cafeína [1:100]	1,0	1,8	5,7 x 10 ⁻¹¹ – 47705

- 25 Región de sinergia definida por CI < 1,0

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, el medio sobrenadante se muestreó para determinación de PGE₂. Las concentraciones inhibidoras medianas se computaron a partir de un mínimo de cuatro concentraciones a lo largo de dos experimentos independientes. Los valores CIs se computaron como se ha descrito.

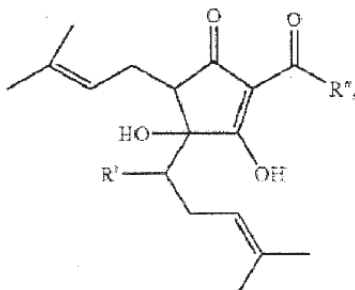
30

La Figura 7 muestra una representación gráfica del parámetro Índice de Combinación computado frente a la concentración de ácidos alfa isomerizados reducidos (RIAA) para ratios RIAA:cafeína de 100:1 (Figura 7A), 10:1 (Figura 7B), 3:1 (Figura 7C), 3:2 (Figura 7D), 1:1 (Figura 7E), 2:3 (Figura 7F), 1:10 (Figura 7G), y 1:100 (Figura 7H).

5 Estos resultados indican que las combinaciones de RIAA y cafeína desde 100:1 a 1:100 RIAA:cafeína exhibían sinergia en la inhibición de la producción de PGE_2 en el modelo de inflamación de las células RAW 267.4 estimuladas con LPS en alguna porción de la curva dosis-respuesta. Para concentraciones de RIAA iguales o menores que 60%, se observó que la sinergia era particularmente eficaz.

REIVINDICACIONES

1. Una composición terapéutica que comprende cafeína y una fracción aislada o derivada de lúpulo, en donde la fracción aislada o derivada de lúpulo comprende un ácido isoalfa reducido del Género A que tiene la fórmula:



(Género A)

5

en donde R' es un grupo hidroxilo;

y en donde R'' se selecciona del grupo constituido por CH(CH₃)₂, CH₂CH(CH₃)₂, y CH(CH₃)CH₂CH₃.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde dicho ácido isoalfa reducido se selecciona del grupo constituido por dihidro-isohumulona, dihidro-isocohumulona, y dihidro-isoadhumulona.

10 3. La composición de la reivindicación 1, en donde la fracción aislada o derivada de lúpulo y la cafeína se encuentran en una ratio de 100:1 a 1:100.

4. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición comprende 0,5 a 10.000 mg de la fracción aislada o derivada de lúpulo.

15 5. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición comprende 50 a 7.500 mg de la fracción aislada o derivada de lúpulo.

6. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición comprende 0,001 a 10 por ciento en peso de la fracción aislada o derivada de lúpulo.

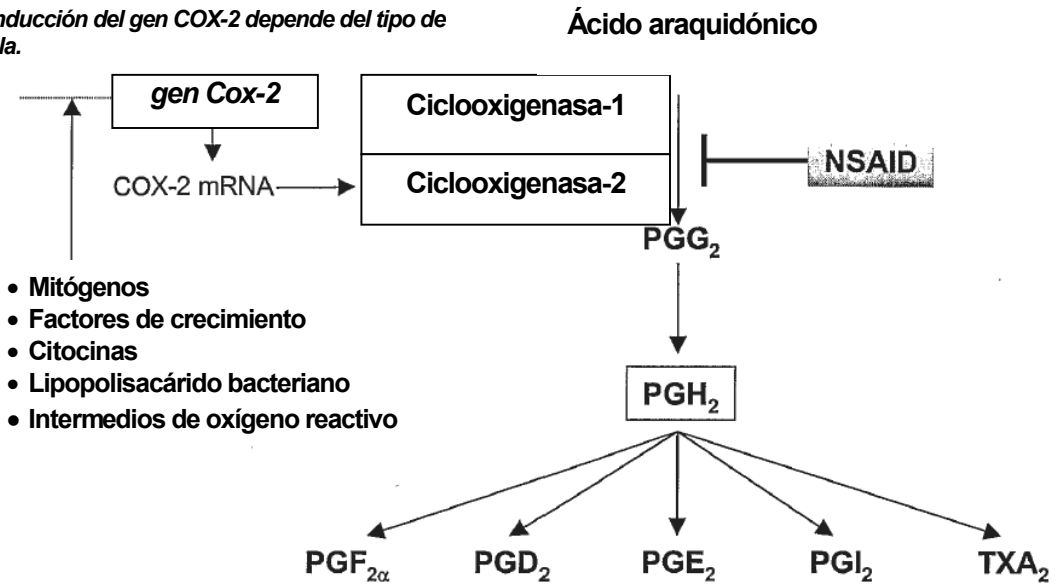
7. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición comprende 0,01 a 1 por ciento en peso de la fracción aislada o derivada de lúpulo.

20 8. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

9. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición está formulada para administración por vía oral, tópica, parenteral, o rectal.

25 10. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo constituido por enfermedades autoinmunes, artritis, artritis reumatoide, artritis gotosa, osteoartritis, artritis juvenil, espasmos menstruales, tendinitis, bursitis, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, gastritis, síndrome de intestino irritable, colitis ulcerosa y cáncer colorrectal, y para uso en el tratamiento de la inflamación en la diabetes tipo I y en la tumefacción producida después de lesión.

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



La matriz de eicosanoides producidos depende del tipo de célula.
 La respuesta celular es función de los receptores intracelulares y extracelulares.

Figura 1

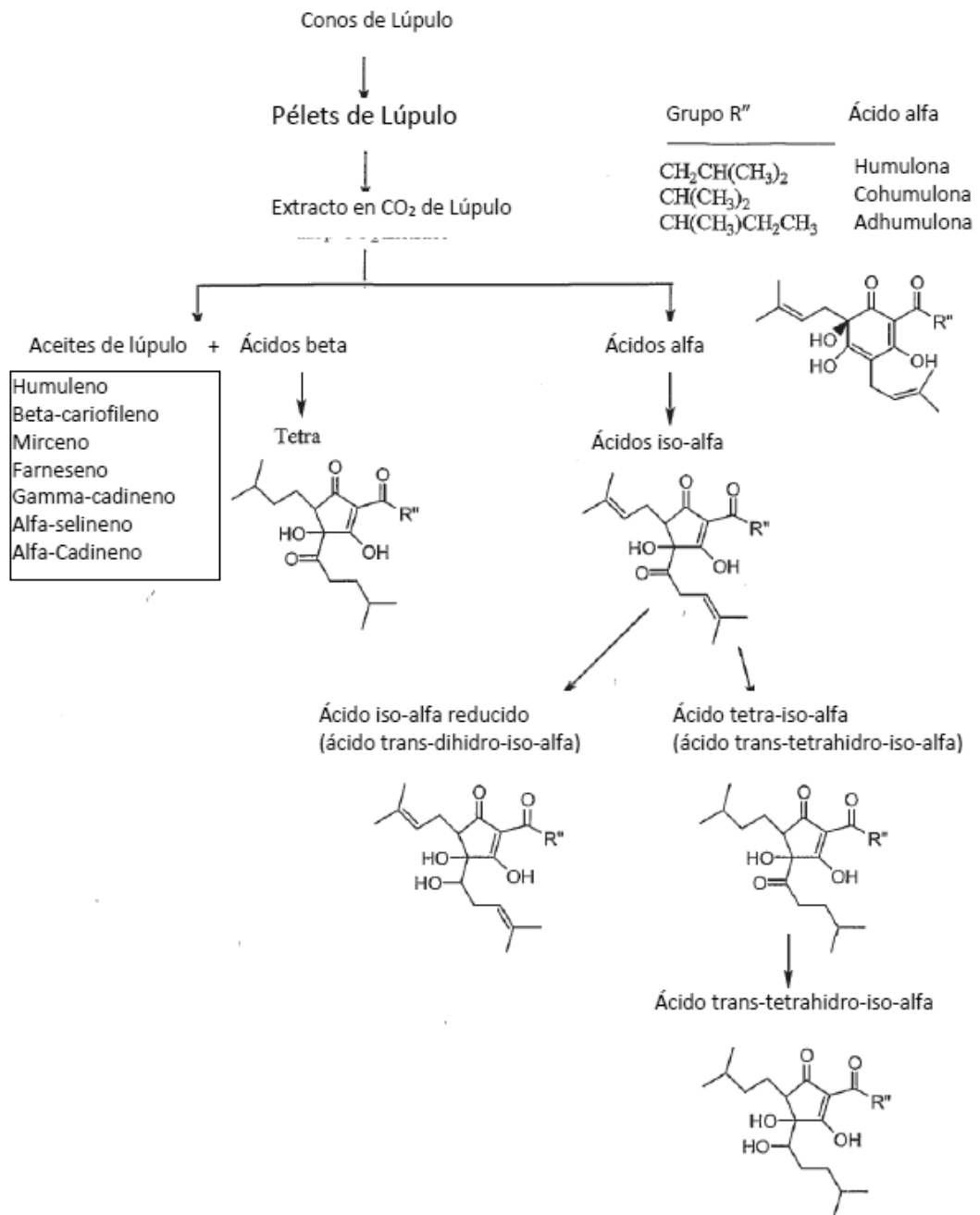


Figura 2

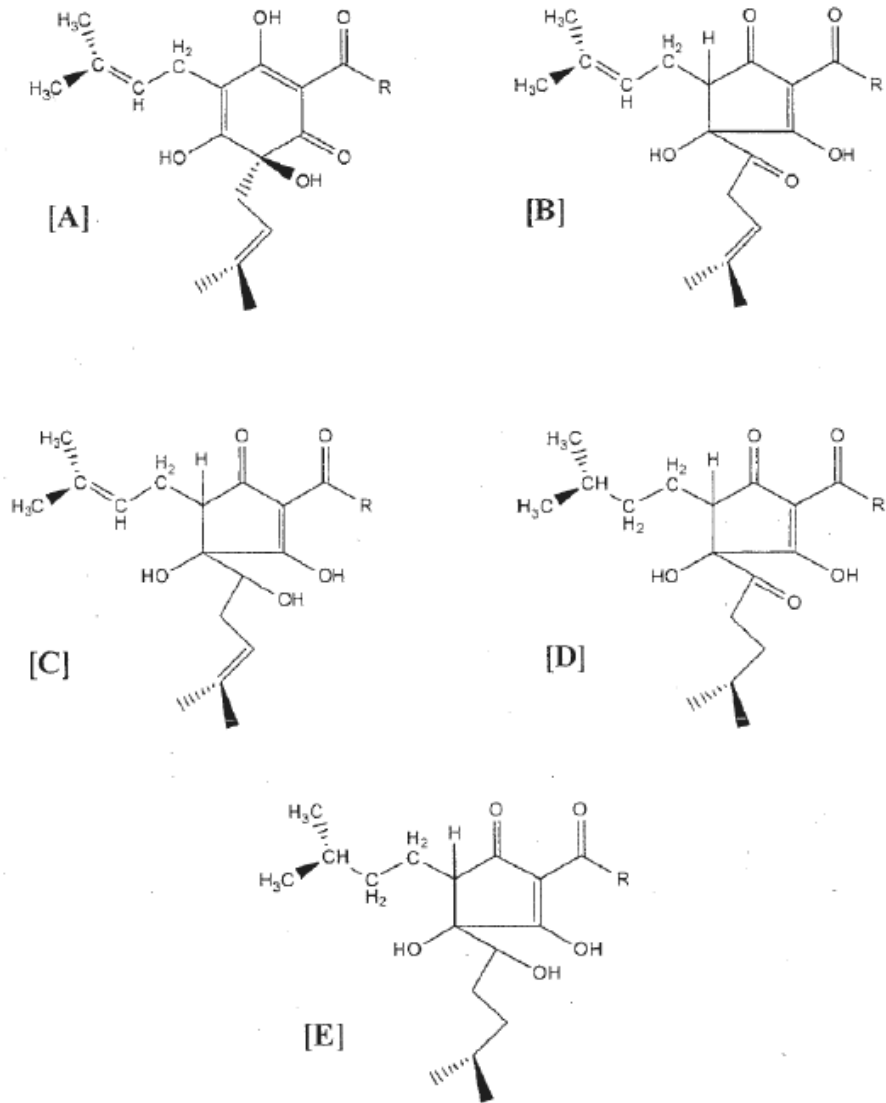
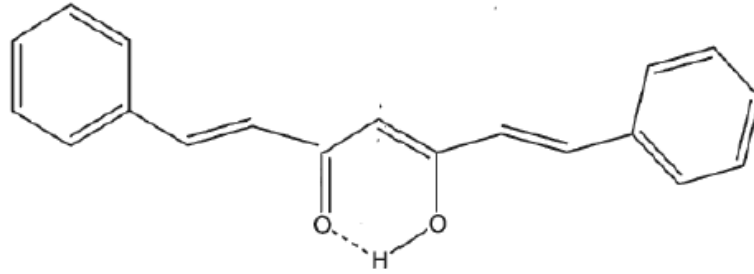
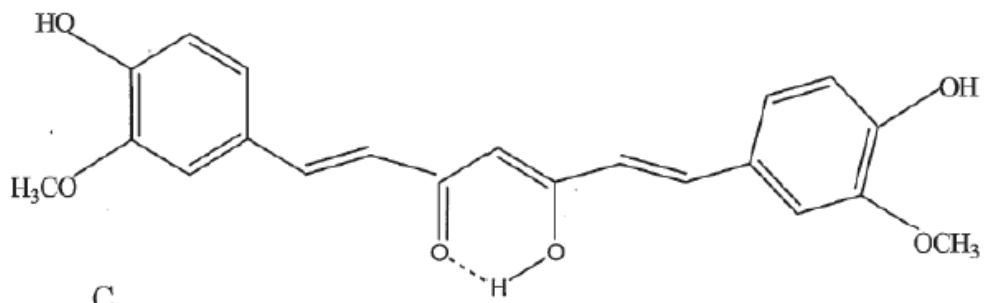


Figura 3

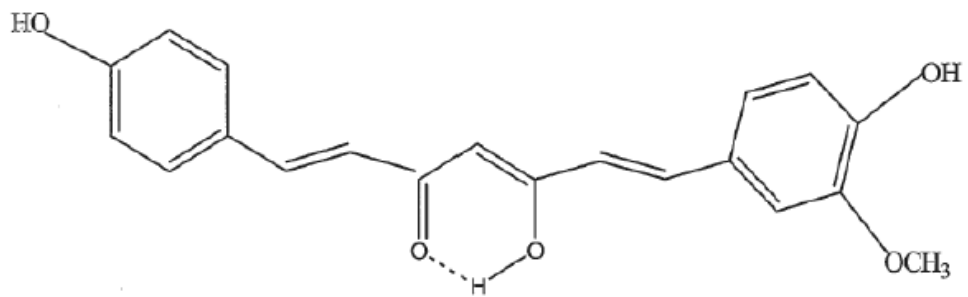
A



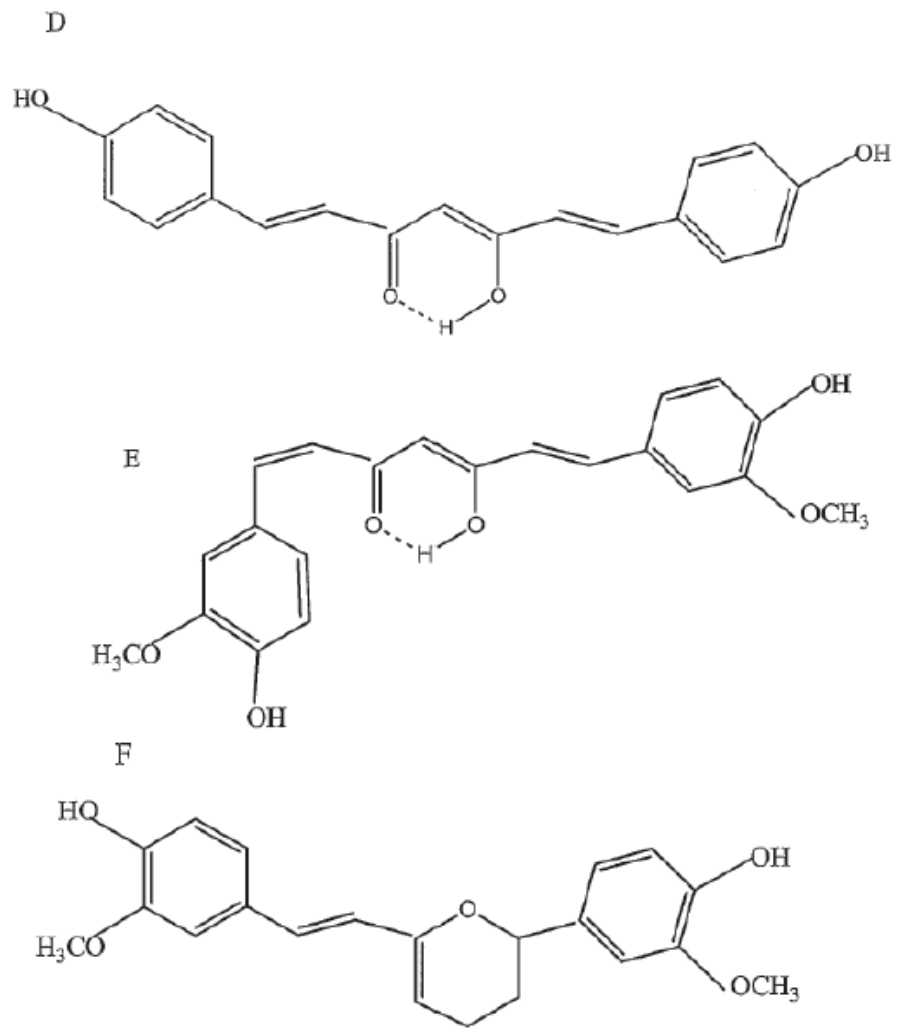
B



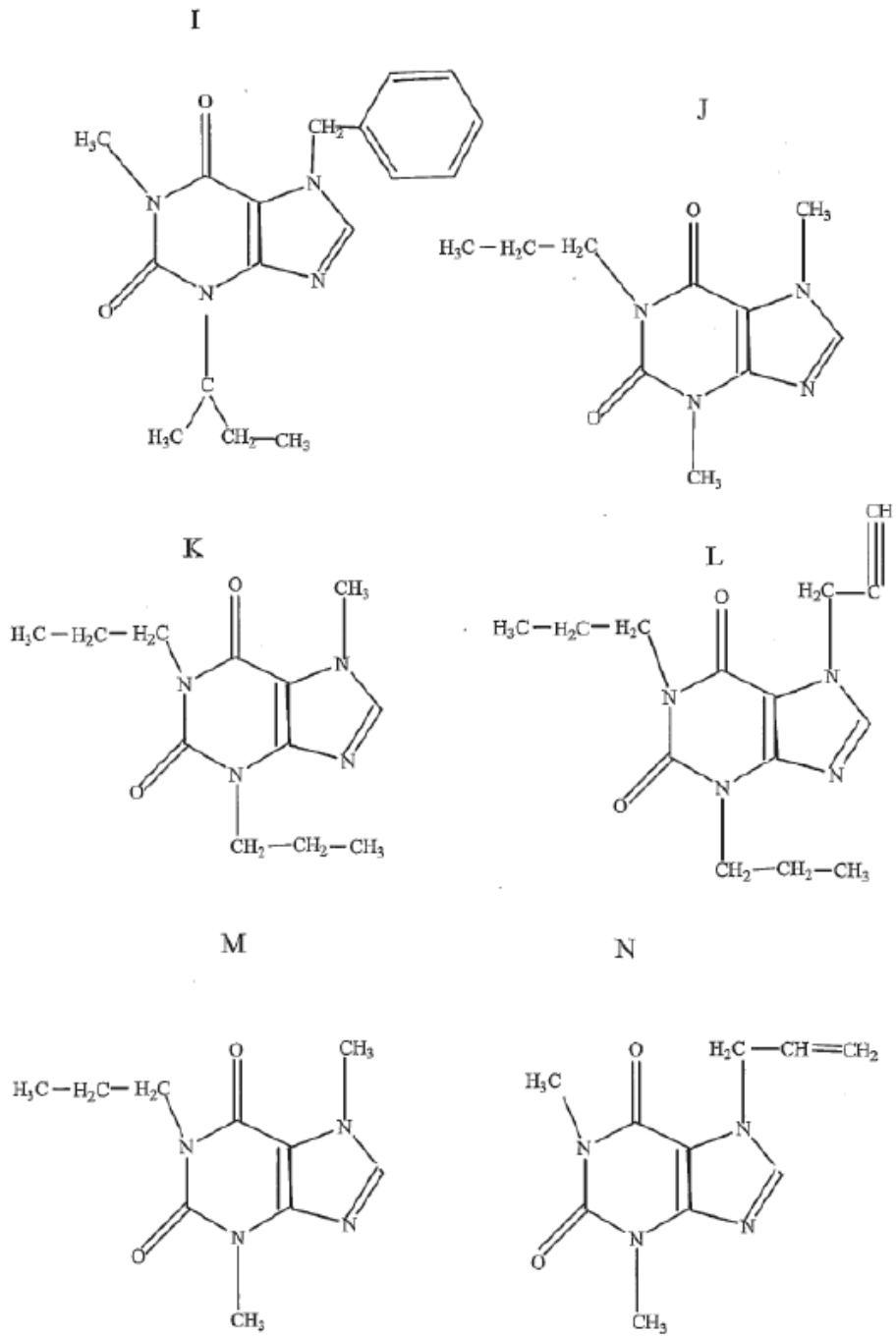
C



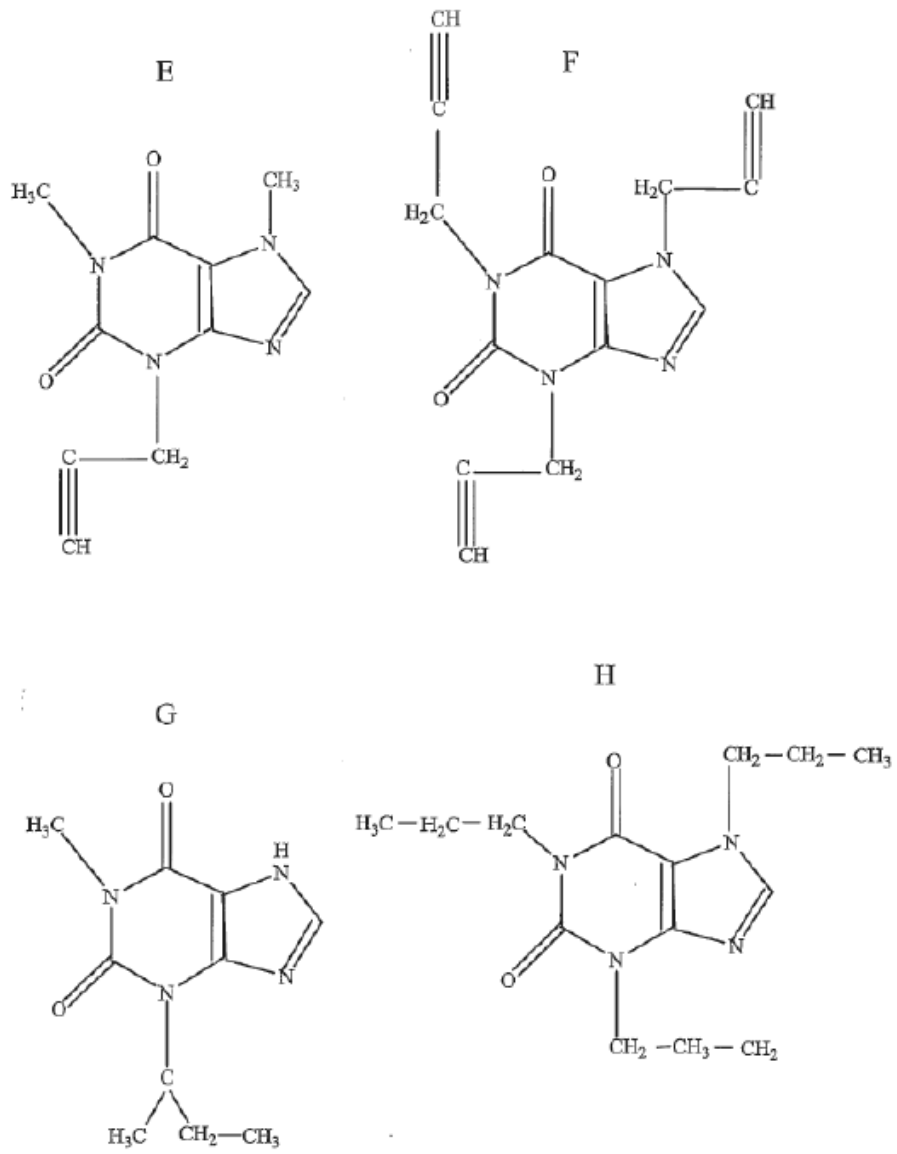
Figuras 4 A-C

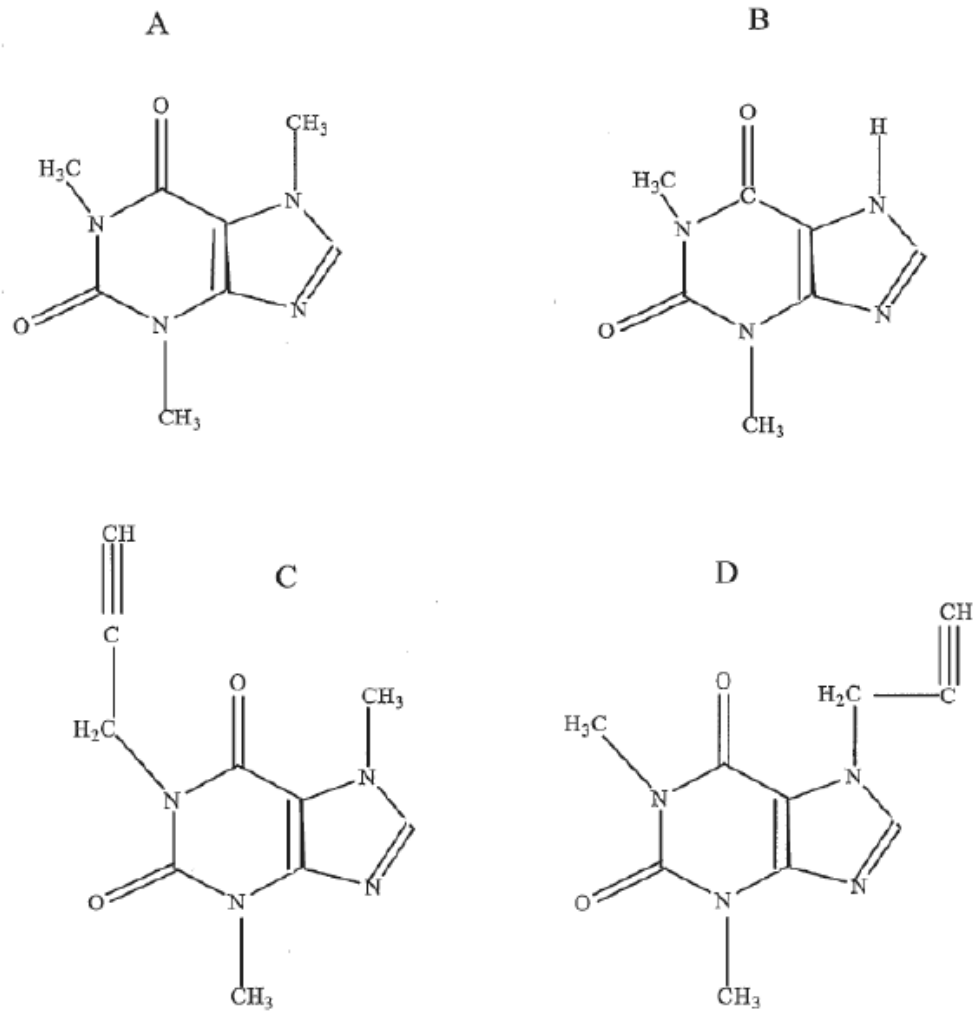


Figuras 4 D-F



Figuras 5 I-N

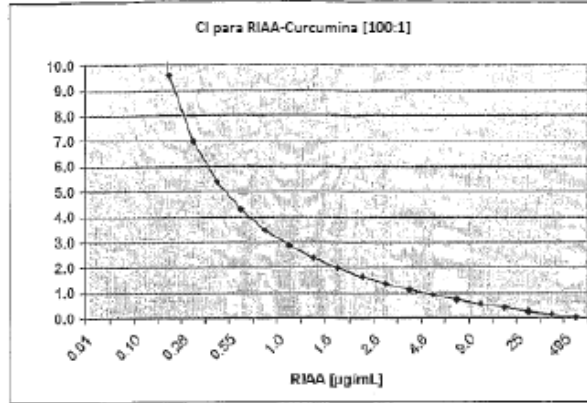




Figuras 5 A-D

RIAA-Curcumina [100:1]

Fa	Cl	RIAA [µg/ml]	Curcumina [µg/ml]
0.02	68.338	0.01	0.000
0.05	28.042	0.04	0.000
0.10	14.609	0.10	0.001
0.15	9.589	0.18	0.002
0.20	6.984	0.28	0.003
0.25	5.376	0.40	0.004
0.30	4.277	0.55	0.006
0.35	3.475	0.73	0.007
0.40	2.862	1.0	0.010
0.45	2.375	1.2	0.012
0.50	1.979	1.6	0.016
0.55	1.549	2.0	0.020
0.60	1.309	2.6	0.026
0.65	1.127	3.4	0.034
0.70	0.910	4.6	0.046
0.75	0.729	6.3	0.060
0.80	0.582	9.0	0.090
0.85	0.469	14	0.139
0.90	0.289	26	0.247
0.95	0.137	63	0.629
1.00	0.031	496	4.960

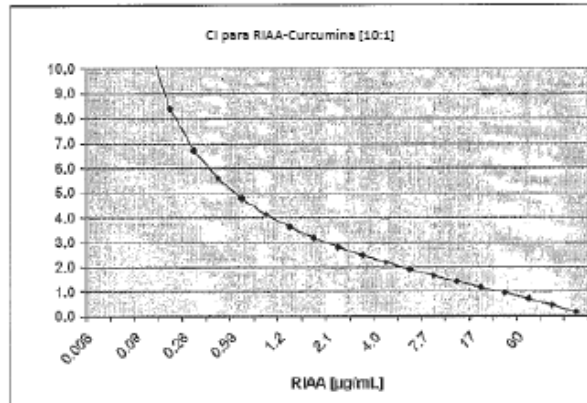


El área sombreada representa la región de sinergia

Figura 6A

RIAA-Curcumina [10:1]

Fa	Cl	RIAA [µg/ml]	Curcumina [µg/ml]
0.02	33.103	0.006	0.001
0.05	16.074	0.025	0.002
0.10	11.23	0.08	0.008
0.15	8.971	0.16	0.016
0.20	6.713	0.26	0.026
0.25	5.696	0.40	0.040
0.30	4.774	0.59	0.059
0.35	4.134	0.8	0.084
0.40	3.614	1.2	0.116
0.45	3.177	1.6	0.156
0.50	2.801	2.1	0.214
0.55	2.471	2.9	0.290
0.60	2.174	4.0	0.396
0.65	1.902	5.6	0.546
0.70	1.650	7.7	0.772
0.75	1.412	11	1.100
0.80	1.182	17	1.700
0.85	0.954	30	3.000
0.90	0.718	60	6.000
0.95	0.457	186	18.600
1.00	0.172	2289	228.900



El área sombreada representa la región de sinergia

Figura 6B

RIAA-Curcumina [3:1]

Fe	Cl	RIAA [µg/mL]	4708 [µg/mL]
0.02	0.073	0.000001	0.000
0.05	0.150	0.00020	0.000
0.10	0.296	0.0017	0.000
0.15	0.389	0.0070	0.002
0.20	0.497	0.018	0.004
0.25	0.622	0.041	0.010
0.30	0.758	0.065	0.021
0.35	0.904	0.17	0.041
0.40	1.069	0.31	0.077
0.45	1.256	0.56	0.14
0.60	1.472	1.0	0.25
0.55	1.726	1.8	0.45
0.60	2.031	3.2	0.81
0.65	2.410	5.0	1.5
0.70	2.894	12	2.9
0.75	3.540	24	6.0
0.80	4.479	56	14
0.85	5.957	153	38
0.90	8.732	584	145
0.95	16	5095	1274
1.00			

El área sombreada representa la región de sinergia

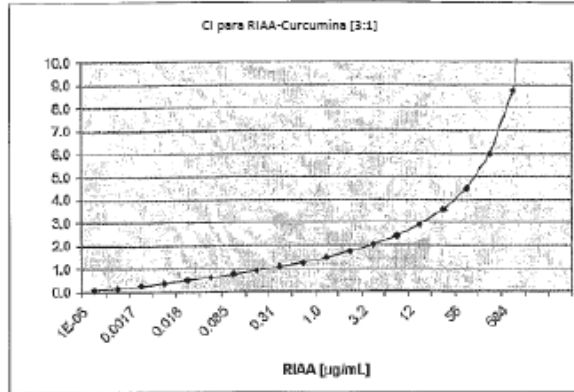


Figura 6C

RIAA-Curcumina [3:2]

Fe	Cl	RIAA [µg/mL]	Curcumina [µg/mL]
0.02	0.029	0.000004	0.000
0.05	0.062	0.00009	0.000
0.10	0.129	0.0006	0.000
0.15	0.202	0.0032	0.001
0.20	0.295	0.0093	0.004
0.25	0.379	0.022	0.009
0.30	0.498	0.049	0.020
0.35	0.610	0.10	0.039
0.40	0.766	0.19	0.076
0.45	0.929	0.36	0.143
0.50	1.138	0.7	0.266
0.55	1.395	1.2	0.494
0.60	1.719	2.3	0.928
0.65	2.140	4.5	1.792
0.70	2.707	9.1	3.524
0.75	3.511	20	7.040
0.80	4.709	48	10.200
0.85	6.33	140	56.000
0.90	11	582	232.800
0.95	25	5830	2332.000
1.00	158		0.000

El área sombreada representa la región de sinergia

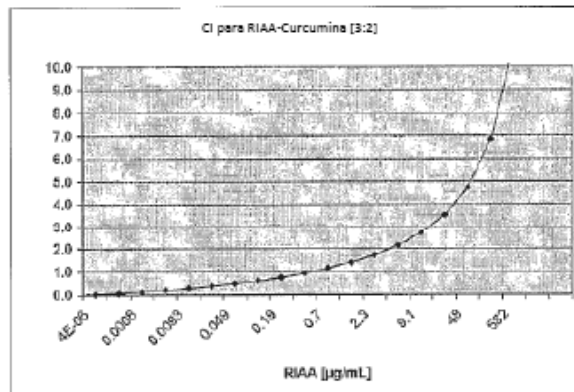


Figura 6D

RIAA-Curcumina [1:1]

Fa	Cl	RIAA [µg/mL]	Curcumina [µg/mL]
0.02	0.267	0.00004	0.00004
0.05	0.468	0.00047	0.00047
0.10	0.575	0.0032	0.0032
0.15	0.715	0.010	0.010
0.20	0.844	0.025	0.025
0.25	0.971	0.052	0.052
0.30	1.096	0.10	0.10
0.35	1.230	0.18	0.177
0.40	1.360	0.31	0.307
0.45	1.518	0.52	0.517
0.50	1.683	0.85	0.864
0.55	1.856	1.4	1.440
0.60	2.077	2.4	2.485
0.65	2.324	4.2	4.200
0.70	2.626	7.5	7.500
0.75	3.006	14.0	14.000
0.80	3.518	30.0	30.000
0.85	4.268	73	73.000
0.90	5.546	237	237.000
0.95	8.569	1000	1000.000
1.00			

El área sombreada representa la región de sinergia

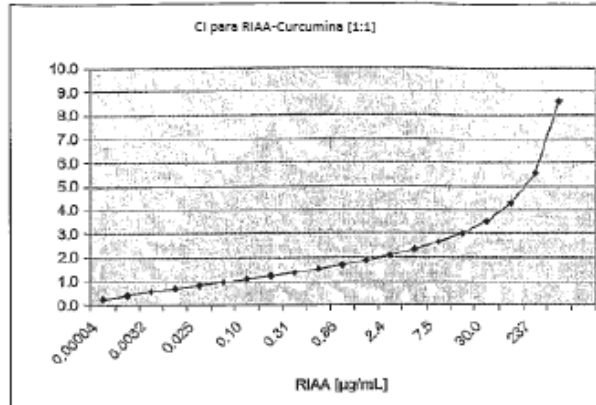


Figura 6E

RIAA-Curcumina [2:3]

Fa	Cl	RIAA [µg/mL]	Curcumina [µg/mL]
0.02	0.181	0.000026	0.00004
0.05	0.377	0.00040	0.00067
0.10	0.682	0.0034	0.0055
0.15	0.991	0.012	0.021
0.20	1.317	0.034	0.057
0.25	1.689	0.078	0.13
0.30	2.056	0.18	0.27
0.35	2.489	0.31	0.52
0.40	2.979	0.57	0.95
0.45	3.544	1.0	1.7
0.50	4.208	1.8	3.0
0.55	4.998	3.2	5.4
0.60	5.965	6.0	9.7
0.65	7.183	11	18
0.70	8.773	21	35
0.75	10.651	43	72
0.80			
0.85			
0.90			
0.95			
1.00			

El área sombreada representa la región de sinergia

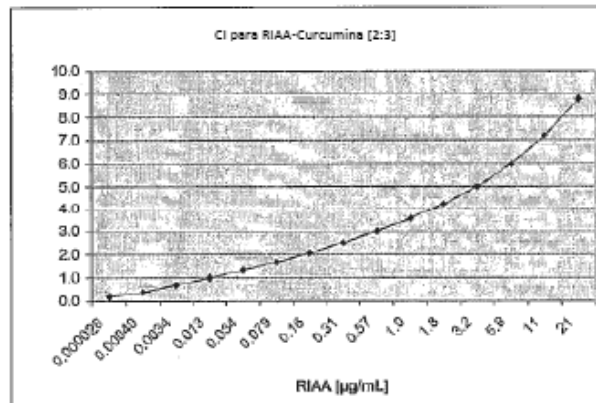


Figura 6F

RIAA-Curcumina [1:10]

Fa	CI	RIAA [µg/mL]	Curcumina [µg/mL]
0.02	0.539	0.00037	0.00637
0.05	0.736	0.00092	0.00932
0.10	0.962	0.0018	0.018
0.15	1.140	0.0051	0.051
0.20	1.298	0.011	0.11
0.25	1.416	0.022	0.22
0.30	1.506	0.039	0.39
0.35	1.744	0.07	0.85
0.40	1.898	0.11	1.1
0.45	2.066	0.17	1.7
0.50	2.227	0.27	2.7
0.55	2.414	0.42	4.2
0.60	2.622	0.68	6.6
0.65	2.960	1.1	11
0.70	3.140	1.9	19
0.75	3.482	3.3	33
0.80	3.623	6.3	63
0.85	4.538	14	140
0.90	5.214	40	400
0.95			
1.00			

El área sombreada representa la región de sinergia

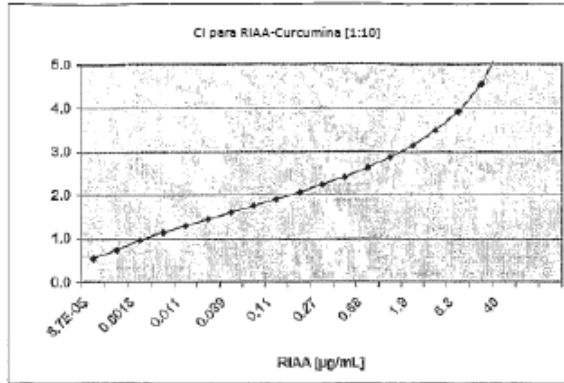


Figura 6G

RIAA-Curcumina [1:100]

Fa	CI	RIAA [µg/mL]	Curcumina [µg/mL]
0.02	0.775	0.0000062	0.00062
0.05	0.884	0.000055	0.0055
0.10	1.006	0.00026	0.026
0.15	1.083	0.00062	0.062
0.20	1.145	0.0012	0.12
0.25	1.200	0.0022	0.22
0.30	1.260	0.0037	0.37
0.35	1.297	0.0058	0.58
0.40	1.344	0.0099	0.99
0.45	1.395	0.013	1.3
0.50	1.436	0.020	2.0
0.55	1.484	0.030	3.0
0.60	1.536	0.045	4.5
0.65	1.591	0.069	6.9
0.70	1.652	0.11	11
0.75	1.723	0.18	18
0.80	1.807	0.32	32
0.85	1.916	0.64	64
0.90	2.070	1.6	160
0.95	2.347	7.2	720
1.00	3.1	197	19700

El área sombreada representa la región de sinergia

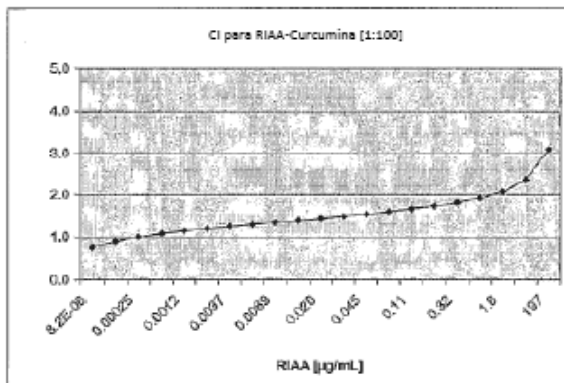
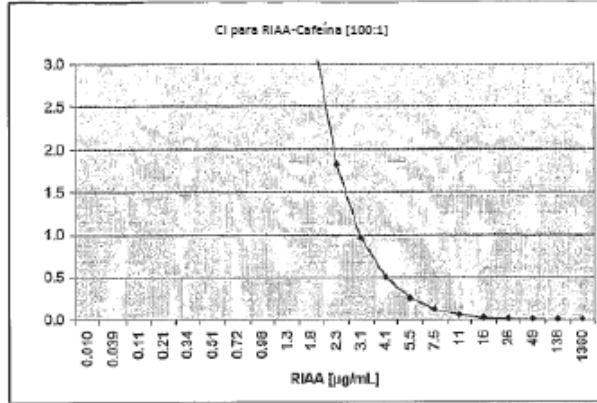


Figura 6H

RIAA-Cafeína [100:1]

Fa	CI	RIAA (µg/mL)	Cafeína (µg/mL)
0.02	483000	0.010	0.000
0.05	23100	0.039	0.000
0.10	2104	0.11	0.0011
0.15	477	0.21	0.0021
0.20	459	0.34	0.0034
0.25	62	0.51	0.0051
0.30	26	0.72	0.0072
0.35	13	0.89	0.010
0.40	6.715	1.3	0.013
0.45	3.481	1.8	0.018
0.50	1.829	2.3	0.023
0.55	0.961	3.1	0.031
0.60	0.496	4.1	0.041
0.65	0.261	5.5	0.055
0.70	0.121	7.5	0.075
0.75	0.054	11	0.11
0.80	0.021	16	0.16
0.85	0.007	26	0.26
0.90	0.002	40	0.40
0.95	0.000	139	1.4
1.00	0.000	1360	14

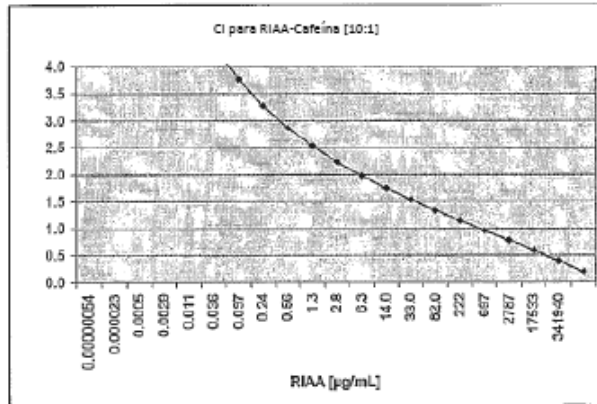


El área sombreada representa la región de sinergia

Figura 7A

RIAA-Cafeína [10:1]

Fa	CI	RIAA (µg/mL)	Cafeína (µg/mL)
0.02	25	0.0000054	0.000002
0.05	14	0.000023	0.000002
0.10	6.673	0.0005	0.000045
0.15	6.514	0.0029	0.00029
0.20	5.252	0.011	0.0011
0.25	4.396	0.036	0.0036
0.30	3.754	0.097	0.010
0.35	3.270	0.24	0.024
0.40	2.866	0.53	0.056
0.45	2.527	1.3	0.13
0.50	2.233	2.8	0.28
0.55	1.974	6.3	0.53
0.60	1.742	14.0	1.4
0.65	1.529	33.0	3.3
0.70	1.330	82.0	8.2
0.75	1.142	222	22
0.80	0.961	597	70
0.85	0.781	2787	278
0.90	0.603	17533	1753
0.95	0.393	341940	34194
1.00	0.195	24207000	

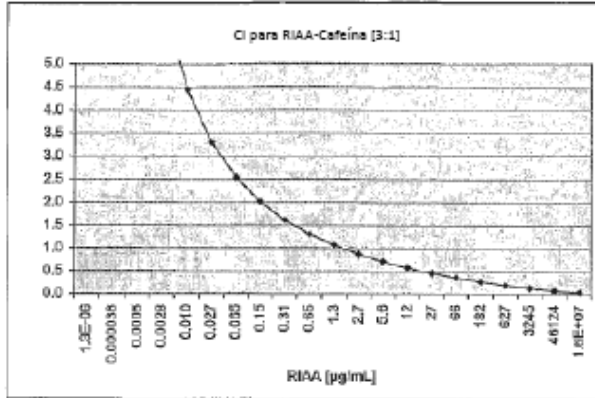


El área sombreada representa la región de sinergia

Figura 7B

RIAA-Cafeína [3:1]

Fa	Cl	RIAA [µg/mL]	Cafeína [µg/mL]
0.02	60	0.0000013	0.000000
0.05	22.000	0.000038	0.000010
0.10	10.324	0.0005	0.000
0.15	8.380	0.0028	0.001
0.20	4.442	0.010	0.002
0.25	3.295	0.027	0.007
0.30	2.540	0.055	0.016
0.35	2.005	0.16	0.037
0.40	1.609	0.31	0.078
0.45	1.303	0.65	0.16
0.50	1.060	1.3	0.33
0.55	0.863	2.7	0.67
0.60	0.700	5.6	1.4
0.65	0.564	12	3.0
0.70	0.448	27	6.8
0.75	0.348	66	17
0.80	0.262	132	46
0.85	0.187	324	157
0.90	0.121	645	311
0.95	0.064	1290	622
1.00	0.023	2580	1244

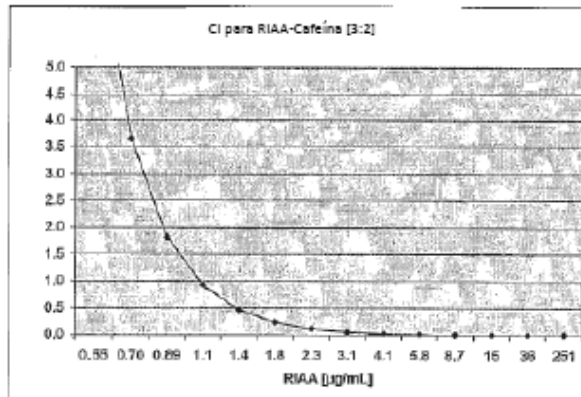


El área sombreada representa la región de sinergia

Figura 7C

RIAA-Cafeína [3:2]

Fa	Cl	RIAA [µg/mL]	Cafeína [µg/mL]
0.02	528000	0.012	0.005
0.05	21100	0.036	0.014
0.10	1040	0.080	0.034
0.15	337	0.15	0.059
0.20	103	0.22	0.080
0.25	38	0.31	0.124
0.30	16	0.42	0.167
0.35	7.534	0.55	0.218
0.40	3.645	0.70	0.281
0.45	1.618	0.89	0.357
0.50	0.821	1.1	0.452
0.55	0.467	1.4	0.572
0.60	0.234	1.8	0.723
0.65	0.114	2.3	0.920
0.70	0.063	3.1	1.240
0.75	0.0230	4.1	1.640
0.80	0.006	5.8	2.304
0.85	0.0030	8.7	3.472
0.90	0.0010	15	6.000
0.95	0.000382	30	14.400
1.00	0.0000058	251	100.400

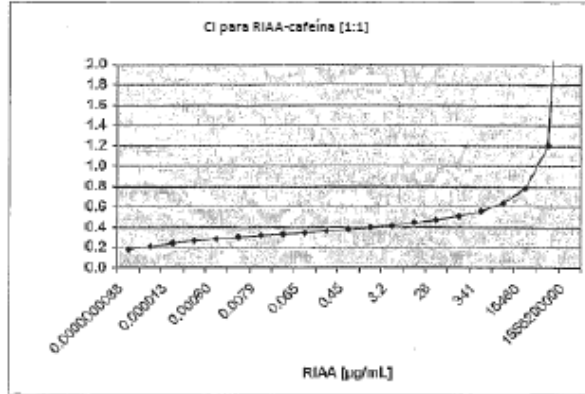


El área sombreada representa la región de sinergia

Figura 7D

RIAA-cafeína [1:1]

Fa	CI	RIAA [µg/mL]	Cafeína [µg/mL]
0.02	0.175	0.000000038	0.00000
0.05	0.209	0.00000035	0.00000
0.10	0.241	0.000013	0.0000
0.15	0.283	0.00011	0.00011
0.20	0.291	0.00060	0.00060
0.25	0.299	0.0024	0.0024
0.30	0.313	0.0079	0.0079
0.35	0.328	0.024	0.024
0.40	0.343	0.068	0.068
0.45	0.350	0.17	0.17
0.50	0.370	0.45	0.45
0.55	0.394	1.2	1.2
0.60	0.415	3.2	3.2
0.65	0.438	8.7	8.7
0.70	0.457	20	20
0.75	0.504	60	60
0.80	0.554	341	341
0.85	0.632	1805	1805
0.90	0.770	16480	16480
0.95	1.205	504050	504050
1.00	5.041	105620000	105620000

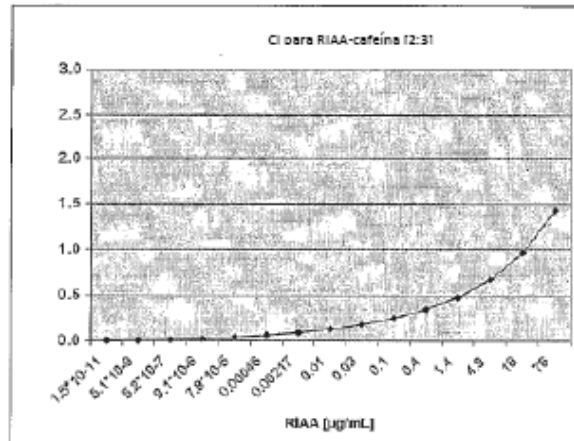


El área sombreada representa la región de sinergia

Figura 7E

RIAA-Cafeína [2:3]

Fa	CI	RIAA [µg/mL]	Cafeína [µg/mL]
0.02	0.001	$1.5 \cdot 10^{-11}$	$2.5 \cdot 10^{-11}$
0.05	0.003	$5.1 \cdot 10^{-9}$	$8.5 \cdot 10^{-9}$
0.10	0.010	$5.2 \cdot 10^{-7}$	$8.7 \cdot 10^{-7}$
0.15	0.021	$9.1 \cdot 10^{-6}$	$1.5 \cdot 10^{-5}$
0.20	0.037	$7.8 \cdot 10^{-5}$	$1.3 \cdot 10^{-4}$
0.25	0.058	0.00046	0.00077
0.30	0.097	0.00217	0.0036
0.35	0.125	0.01	0.01
0.40	0.177	0.03	0.06
0.45	0.247	0.1	0.2
0.50	0.343	0.4	0.7
0.55	0.478	1.4	2.3
0.60	0.673	4.9	8.2
0.65	0.936	19	30
0.70	1.428	76	127
0.75	2.215	357	595
0.80	3.702	2105	3508
0.85	7.037	18069	30115
0.90			
0.95			
1.00			

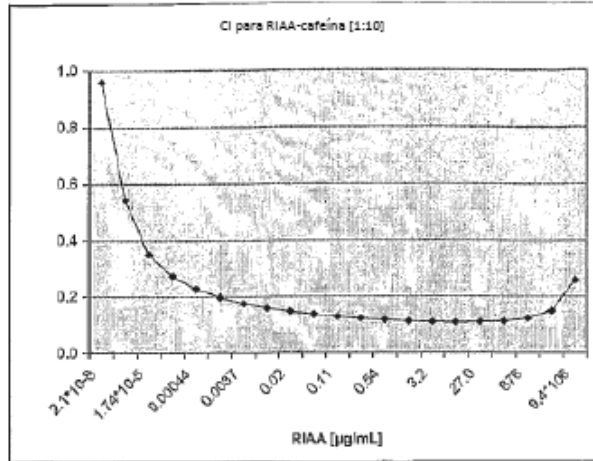


El área sombreada representa la región de sinergia

Figura 7F

RIAA-cafeína [1:10]

Fa	Cl	RIAA [µg/mL]	Cafeína [µg/mL]
0.02	0.958	2.1*10 ⁻⁴	2.1*10 ⁻⁷
0.05	0.542	8.9*10 ⁻⁷	8.9*10 ⁻⁴
0.10	0.351	1.74*10 ⁻⁵	1.74*10 ⁻⁴
0.15	0.272	0.00011	0.0011
0.20	0.227	0.00044	0.0044
0.25	0.197	0.0014	0.014
0.30	0.175	0.0037	0.037
0.35	0.159	0.01	0.09
0.40	0.147	0.02	0.2
0.45	0.137	0.05	0.5
0.50	0.128	0.11	1.1
0.55	0.122	0.24	2.4
0.60	0.117	0.54	5.4
0.65	0.113	1.3	13
0.70	0.110	3.2	32
0.75	0.109	8.9	89
0.80	0.110	27.0	270
0.85	0.113	107	1070
0.90	0.122	676	6760
0.95	0.146	13202	132020.000
1.00	0.256	8.4*10 ²	9.4*10 ⁷

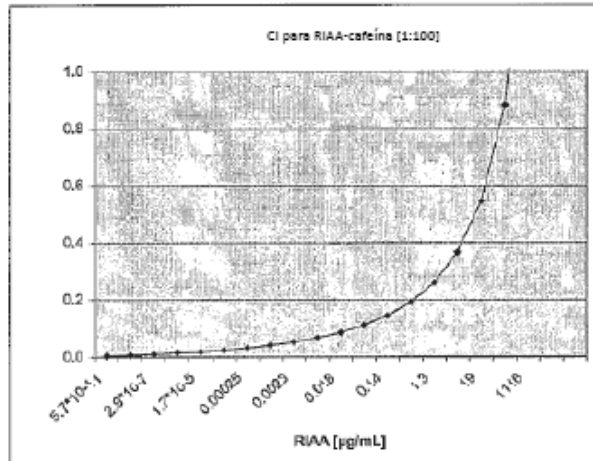


El área sombreada representa la región de sinergia

Figura 7G

RIAA-cafeína [1:100]

Fa	Cl	RIAA [µg/mL]	Cafeína [µg/mL]
0.02	0.003	5.7*10 ⁻¹¹	5.7*10 ⁻⁴
0.05	0.006	6.7*10 ⁻¹¹	6.7*10 ⁻⁴
0.10	0.008	2.9*10 ⁻⁷	2.9*10 ⁻⁴
0.15	0.013	2.9*10 ⁻⁴	2.9*10 ⁻⁴
0.20	0.017	1.7*10 ⁻⁴	1.7*10 ⁻³
0.25	0.023	7.1*10 ⁻⁵	7.1*10 ⁻³
0.30	0.031	0.00026	0.025
0.35	0.040	0.0008	0.08
0.40	0.051	0.0023	0.23
0.45	0.066	0.0065	0.65
0.50	0.085	0.018	1.8
0.55	0.110	0.049	4.9
0.60	0.143	0.14	13.7
0.65	0.190	0.40	40.1
0.70	0.259	1.3	126
0.75	0.366	4.5	446
0.80	0.543	19	1900
0.85	0.882	109	10900
0.90	1.893	1116	111600
0.95		47705	4770500
1.00			



El área sombreada representa la región de sinergia

Figura 7H