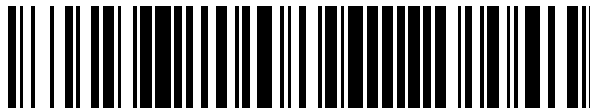


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 507**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/53** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2012 E 12401234 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2596798**

54 Título: **Fracción de Plectranthus amboinicus con actividad antiartrítica**

30 Prioridad:

**22.11.2011 TW 100142840**

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

**25.10.2016**

73 Titular/es:

**ONENESS BIOTECH CO. (100.0%)  
7F-1, No.3-1, Yuanqu Street Nangang District  
115 Taipei, TW**

72 Inventor/es:

**KO, FENG-NIEN;  
CHEN, JEN-WEI y  
YANG, WEN-LING**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 587 507 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

Fracción de *Plectranthus amboinicus* con actividad antiartrítica

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un extracto de planta, que, en particular, es una fracción de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng con enriquecimiento de la actividad antiartrítica.

**Antecedentes de la invención**

10 La artritis es la enfermedad autoinmune más común. La característica de la enfermedad es la inflamación de los tejidos sinoviales con la erosión progresiva del hueso lo que conduce a la mala alineación de la articulación y la discapacidad. La naturaleza persistente de la artritis sugiere una disfunción inmune no sólo local sino también sistémica, que consiste en el predominio de la respuesta pro-inflamatoria y la sobre producción de células inflamatorias y sustancias inflamatorias, tales como células T CD4<sup>+</sup>, células B y citoquinas inflamatorias. Todo lo cual causa la destrucción a largo plazo de los tejidos de las articulaciones. En general se cree que la infección de un huésped por un patógeno exógeno desconocido inicia el curso de la artritis por medio de la activación de las células T, induciendo de este modo múltiples reacciones, tales como la activación de los monocitos, macrófagos y la estimulación directa de la proliferación de células sinoviales y endoteliales, así como la producción de citoquinas inflamatorias, proteasas, y anticuerpos. Además, se han implicado citoquinas inflamatorias en la progresión de la enfermedad de la artritis. Por ejemplo, TNF- $\alpha$  es un elemento clave en la cascada de citoquinas pro-inflamatorias mediante la estimulación de la producción de prostaglandina E y colagenasa, así como otras citoquinas tales como la interleucina-1 (IL-1) y la interleucina-6 (IL-6). TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  también estimulan la secreción de metaloproteinasas de matriz y ejercen un efecto directo en los múltiples tejidos dentro de la articulación, incluyendo los condrocitos, macrófagos, fibroblastos sinoviales, y osteoclastos lo que conduce a la destrucción localizada de la articulación. Por otra parte, IL-6 puede aumentar aún más las células inflamatorias en el tejido de las articulaciones, estimular la proliferación de osteoclastos y reforzar el papel de IL-1 $\beta$ . En general, la sustancial comunicación entrecruzada entre las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17 es esencial para inducir la destrucción de la articulación, la inhibición de los condrocitos, y la perturbación de la restauración de los tejidos degenerados en la artritis. Por lo tanto, aparte de los agentes inmunosupresores tradicionales y los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, el pensamiento clínico actual mayoritario es desarrollar antagonistas biológicos destinados específicamente a los factores o células inflamatorias mencionados anteriormente, tales como los antagonistas de TNF- $\alpha$  e IL-6, a fin de reducir o prevenir el daño a las articulaciones y mantener la funcionalidad. Sin embargo, este tipo de tratamiento es invasivo, y la eficacia puede desvanecerse posteriormente. Además, al menos la mitad de los pacientes con artritis no responden a la combinación de fármacos y agentes biológicos tradicionales para la artritis. Por lo tanto, es importante desarrollar nuevas terapias convenientes, seguras y eficaces.

35 *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, una hierba perenne originada principalmente en Malasia, Brasil, China e India, pertenece a la familia de las Labiadas, otras denominaciones de la cual son *Agastache rugosa*, *Lysimachia capillipes* Hemsl, menta verde, Patchouly, menta de india, o *Pogostemon Cablin*. La *Plectranthus amboinicus* tiene hojas que son gruesas, de pequeño volumen, opuestas, ampliamente ovaladas, dentadas en el margen con ápice redondeado o agudo puro. La hierba es aproximadamente de 15 a 30 cm de altura, está cubierta de pelos finos, y tiene un fuerte olor acre. Según los registros históricos, *Plectranthus amboinicus* es un tipo de medicina herbal china con eficacia para prevenir los resfriados, reforzar la inmunidad del cuerpo, y reducir síntomas tales como la hinchazón del oído, la inflamación y la fiebre. Como medicamento tradicional chino es antiinflamatorio, carminativo y capaz de la desintoxicación y del alivio de síntomas como la fiebre, amigdalitis, faringitis, neumonía, escalofríos y calor, dolor de cabeza, náuseas del pecho y abdomen, vómitos, diarrea, estómago débil, bazo frío y otros. El jugo fresco de *Plectranthus amboinicus* también es eficaz para las abrasiones, cortes, quemaduras, picaduras de insectos, hinchazón desconocida, forúnculos y llagas, inflamación del oído, dolor de garganta, hinchazón de veneno, contusiones y similares. También tiene efectos considerables en problemas de la piel causados por microorganismos, tales como la dermatitis seborreica, eczema, acné, alergias, piel seca, foliculitis del cuero cabelludo, y efectos significativos en el blanqueamiento de la piel, la eliminación de la fatiga, y la eliminación de una variedad de tiña de la piel.

50 La solicitud de patente de Taiwán N° 092135016 ha divulgado un método para preparar extractos brutos de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng que comprende las etapas de: (a) hacer presión sobre las hojas de la planta para obtener un jugo; (b) añadir alcohol al jugo de la etapa (a) para alcanzar una concentración final en alcohol de 70-80% y, a continuación mantenerlo a temperatura baja; (c) ajustar el valor del pH del jugo que contiene alcohol de la etapa (b) a pH 5,0 ~ 7,0, y a continuación, mantenerlo a temperatura baja; (d) filtrar para eliminar las impurezas en el jugo que contiene alcohol de la etapa (c); (e) destilar y concentrar el jugo puro obtenido como resultado de la etapa (d) para recoger el destilado, y ajustar el valor del pH de tal destilado a pH 5,0 ~ 7,0; y (f) filtrar al vacío el destilado de la etapa (e) para obtener extractos transparentes marrón oscuro de *Plectranthus amboinicus*.

55 La solicitud de patente de Taiwán N° 093134346 ha proporcionado un extracto acuoso de hojas de *Plectranthus amboinicus* que es eficaz en el tratamiento del cáncer y/o tumor que tiene un peso molecular de más de 50 kD.

La solicitud de patente de Taiwán N° 086118191 también divulga un tipo de extracto acuoso de *Pogostemon cablin* o *Agastache rugosa* capaz de prevenir y tratar la infección por *Haemophilus influenzae*. La preparación de dicho extracto implica una elución por un reactivo compuesto de 90,5% de etanol, 4,5% de metanol y 5,0% de isopropanol.

5 Además, la solicitud de patente de Taiwán N° 096145943, es decir, el documento de patente de invención de Taiwán N° I-335225, también ha proporcionado un extracto de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng para el tratamiento de trastornos de la piel y la promoción de la cicatrización de heridas, en particular, la curación de heridas en pacientes con diabetes. La invención como se divulga en esta patente se caracteriza por el uso de una combinación de la separación de sólido-líquido (separación de agitación) y un procesamiento específico, que comprende agitar una resina de adsorción (por ejemplo, DIALON) con el extracto de *Plectranthus amboinicus*, y aislar diversas fracciones de dicho extracto mediante el uso de diferentes disolventes en las etapas de separación respectivas.

10 Además, la solicitud de patente de Taiwán N° 095134243, es decir el documento de patente de invención de Taiwán N° 1320714, ha divulgado un extracto acuoso de *Plectranthus amboinicus* Benth que tiene eficacia en el tratamiento de la artritis reumatoide. El extracto se empapó en una cantidad apropiada de disolvente muy polar, se filtró, se condensó a presión reducida mediante un concentrador giratorio, se diluyó con un disolvente, y luego se separó en una columna. Opcionalmente, se podrían utilizar cuatro segmentos de diferentes disolventes de alta polaridad a baja polaridad (referidos como disolvente de alta polaridad, disolvente de sub alta polaridad, disolvente de media polaridad y disolvente de baja polaridad) para la elución continua.

### Breve compendio de la invención

20 La presente invención se basa en un desarrollo adicional mejorado de los procesos para la preparación de un extracto de *Plectranthus amboinicus*, que, de forma inesperada, muestra gran actividad antiartrítica. En particular, dicho extracto se prepara mediante la elución del extracto bruto de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng por 50% ~ 95% de solución alcohólica, o por una cromatografía de fase normal.

25 En consecuencia, la presente invención proporciona un extracto de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng con enriquecimiento de la actividad antiartrítica preparado por un proceso que comprende las etapas de extracción de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng seco con una solución alcohólica para obtener un extracto bruto y elución del extracto bruto mediante una cromatografía en fase normal utilizando hexano como un primer disolvente y hexano/acetato de etilo como un segundo disolvente para obtener un eluato del segundo disolvente.

30 En una divulgación, el extracto de *Plectranthus amboinicus* con enriquecimiento de la actividad antiartrítica se caracteriza porque: dicho extracto se obtiene eluyendo el extracto bruto de *Plectranthus amboinicus* usando una solución alcohólica de 50% ~ 95%, preferiblemente usando una solución alcohólica de 70% ~ 95%, y más preferiblemente usando una solución alcohólica de 95%. En los ejemplos de la presente divulgación, la solución alcohólica es de etanol.

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para preparar un extracto de *Plectranthus amboinicus* con enriquecimiento de la actividad antiartrítica que comprende la extracción de la planta o polvo seco de *Plectranthus amboinicus* en un disolvente para obtener un extracto bruto, y elución del extracto bruto producido por cromatografía usando solución alcohólica de 50% ~ 95% para aislar un extracto con enriquecimiento de la actividad antiartrítica.

40 Según una divulgación, es preferible eluir el extracto bruto usando una solución alcohólica de 70% ~ 95%, y más preferiblemente usando una solución alcohólica de aproximadamente 95%, para aislar un extracto con enriquecimiento de la actividad antiartrítica.

45 En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un extracto de *Plectranthus amboinicus* con enriquecimiento de la actividad antiartrítica que comprende extraer el polvo seco de *Plectranthus amboinicus* con un disolvente para obtener un extracto bruto, y eluir el extracto bruto producido por cromatografía de fase normal usando hexano como un primer disolvente y hexano/acetato de etilo como un segundo disolvente para aislar un extracto con enriquecimiento de la actividad antiartrítica.

En algunas formas de realización de la presente invención, el extracto obtenido con enriquecimiento de la actividad antiartrítica se puede eluir adicionalmente mediante disolventes tales como acetato de etilo, acetato de etilo/metanol, y/o metanol.

50 En todavía otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para prevenir o tratar la artritis que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz del extracto de *Plectranthus amboinicus* con enriquecimiento de la actividad antiartrítica como se describe en el presente documento.

55 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar la artritis que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto de *Plectranthus amboinicus* con enriquecimiento de la actividad antiartrítica como se describe en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los detalles de una o más formas de realización de la invención se exponen en la siguiente descripción. Otras características o ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias formas de realización, y también de las reivindicaciones adjuntas.

#### Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

- 5 El sumario anterior, así como la descripción detallada de la invención siguiente, se entenderán mejor cuando se lean conjuntamente con los dibujos adjuntos. A los efectos de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos formas de realización que son actualmente preferidas. Debe entenderse, sin embargo, que la invención no está limitada a las formas de realización preferidas mostradas.

En los dibujos:

- 10 La Figura 1 es un patrón de HPLC de ON-024 detectado a una longitud de onda de 200 nm, en el que hay seis picos de absorción a tiempos de retención de 13, 20, 21, 27, 37 y 39 minutos.

La Figura 2 es un patrón de HPLC de ON-024 detectado a una longitud de onda de 320 nm, en el que hay un pico de absorción de ácido cafeico a un tiempo de retención de 13 minutos, un pico de absorción de ácido rosmarínico a 27 minutos, y un pico de absorción a 35 minutos.

- 15 La Figura 3 es un patrón de HPLC de ON-025 detectado a una longitud de onda de 200 nm, en el que hay un pico de absorción a un tiempo de retención de 45 minutos, y un pico de absorción de carvacrol a 55 minutos.

La Figura 4 es un patrón de HPLC de ON-025 detectado a una longitud de onda de 320 nm, en el que hay ocho picos de absorción en un tiempo de retención de 39 a 43 minutos y un pico de absorción de cirsimaritin a 45 minutos.

- 20 La Figura 5 es un patrón de HPLC de ON-066 detectado a una longitud de onda de 200 nm, en el que hay un pico de absorción de cirsimaritin a un tiempo de retención de 45 minutos y un pico de absorción de carvacrol a 55 minutos.

- 25 La Figura 6 es un patrón de HPLC de ON-066 detectado a una longitud de onda de 320 nm, en el que hay un pico de absorción de cirsimaritin a un tiempo de retención de 45 minutos y un pico de absorción de salvigenin a 62 minutos.

La Figura 7 es un patrón de HPLC de ON-080 detectado a una longitud de onda de 200 nm, en el que hay un pico de absorción de carvacrol a un tiempo de retención de 55 minutos.

- 30 La Figura 8 es un patrón de HPLC de ON-080 detectado a una longitud de onda de 320 nm, en el que hay tres picos de absorción a un tiempo de retención de 18 a 21 minutos, tres picos de absorción de 37 a 41 minutos, dos picos de absorción de 43-45 minutos, un pico de absorción de cirsimaritin a 45 minutos, cuatro picos de absorción de 50 a 54 minutos, y un pico de absorción de salvigenin a 62 minutos.

#### Descripción detallada de la invención

- 35 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención.

Tal como se usa en este documento, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una muestra" incluye una pluralidad de tales muestras y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la técnica.

- 40 Tal como se utiliza en este documento, el término "para prevenir" o "prevención" se refiere en general a diferentes grados de detención de la acción o el progreso. Prevenir es disminuir el grado de o detener eficazmente algo, o ambos. Los términos "tratamiento" o "tratar", como se usan en este documento, se refieren a mejorar las condiciones.

- 45 El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en este documento, se refiere a la cantidad de componentes de la composición o composición farmacéutica de la invención sola o en combinación con otros medicamentos que podrían proporcionar beneficios terapéuticos en el tratamiento.

- 50 La presente divulgación proporciona un extracto de *Plectranthus amboinicus* con enriquecimiento de la actividad antiartrítica, que se caracteriza por tener un pico de absorción de cirsimaritin a un tiempo de retención de aproximadamente 45 minutos en un patrón de HPLC detectado a una longitud de onda de aproximadamente 320 nm. Este se puede obtener mediante la elución del extracto bruto usando una solución alcohólica de 50% ~ 95% o por una cromatografía de fase normal. El eluato resultante es diferente a los extractos conocidos de *Plectranthus amboinicus* en que está enriquecido en su actividad antiartrítica y por lo tanto es capaz de tratar o prevenir la artritis.

Según la presente divulgación, cuando el extracto de *Plectranthus amboinicus* con enriquecimiento de la actividad antiartrítica es aislado por elución del extracto bruto como se describe en este documento usando una solución alcohólica de 50% ~ 95%, hay un pico de absorción a un tiempo de retención de aproximadamente 45 minutos y un pico de absorción de carvacrol a aproximadamente 55 minutos en un patrón de HPLC detectado a una longitud de onda de aproximadamente 200 nm, como se muestra en la Figura 3; también hay 8 picos de absorción a un tiempo de retención de 39 a 43 minutos y un pico de absorción de cirsimaritin a aproximadamente 45 minutos en un patrón de HPLC detectado a una longitud de onda de aproximadamente 320 nm, como se muestra en la Figura 4.

Según la presente divulgación, cuando el extracto de *Plectranthus amboinicus* con enriquecimiento de la actividad antiartrítica se aísla por elución del extracto bruto como se describe en el presente documento usando una solución alcohólica de 70% ~ 95%, hay un pico de absorción de cirsimaritin a un tiempo de retención de aproximadamente 45 minutos y un pico de absorción de carvacrol a aproximadamente 55 minutos en un patrón de HPLC detectado a una longitud de onda de aproximadamente 200 nm, como se muestra en la Figura 5; también hay un pico de absorción de cirsimaritin a un tiempo de retención de aproximadamente 45 minutos y un pico de absorción de salvigenin a aproximadamente 62 minutos en un patrón de HPLC detectado a una longitud de onda de aproximadamente 320 nm, como se muestra en la Figura 6.

Según la presente divulgación, cuando el extracto de *Plectranthus amboinicus* con enriquecimiento de la actividad antiartrítica se aísla mediante el uso de una cromatografía en fase normal, hay un pico de absorción de carvacrol a un tiempo de retención de aproximadamente 55 minutos en un patrón de HPLC detectado a una longitud de onda de alrededor de 200 nm, como se muestra en la Figura 7; también hay tres picos de absorción a un tiempo de retención de 18 a 21 minutos, tres picos de absorción a un tiempo de retención de 37 a 41 minutos, dos picos de absorción a de 43-45 minutos, un pico de absorción de cirsimaritin a aproximadamente 45 minutos, cuatro picos de absorción de 50 a 54 minutos, y un pico de absorción de salvigenin a aproximadamente 62 minutos en un patrón de HPLC detectado a una longitud de onda de aproximadamente 320 nm, como se muestra en la Figura 8.

En la presente divulgación, el extracto de *Plectranthus amboinicus* con enriquecimiento de la actividad antiartrítica puede ser aislado por cromatografía, la cual comprende las etapas de: extracción de la planta o polvo seco de *Plectranthus amboinicus* en un disolvente para obtener un extracto bruto, y elución del extracto bruto obtenido mediante una cromatografía usando una solución alcohólica de 50% ~ 95% para aislar un extracto con enriquecimiento de la actividad antiartrítica.

En una divulgación, es preferible eluir el extracto bruto como se describe en este documento con una solución alcohólica de 70% ~ 95%, o más preferiblemente con una solución alcohólica de 95%. Según esta divulgación, la solución alcohólica para la elución puede ser metanol o etanol. En una divulgación preferida, se usa el etanol.

Se proporciona además un método para preparar un extracto de *Plectranthus amboinicus* con enriquecimiento de la actividad antiartrítica que comprende la extracción de la planta o polvo seco de *Plectranthus amboinicus* en un disolvente para obtener un extracto bruto, y la elución del extracto bruto producido mediante una cromatografía en fase normal utilizando hexano como un primer disolvente y hexano/acetato de etilo como un segundo disolvente para aislar un extracto con enriquecimiento de la actividad antiartrítica. Según una forma de realización de esta invención, la relación en volumen de hexano a acetato de etilo en el disolvente "hexano/acetato de etilo" es 1: 1.

Según la presente invención, el *Plectranthus amboinicus* a extraer es la planta seca. Es preferible extraer la planta en forma de polvo. El extracto bruto de la planta se obtiene mediante la extracción en una solución alcohólica. Según una forma de realización de la presente invención, se utiliza una solución de etanol de aproximadamente 95%.

Según una divulgación se puede usar una solución de etanol de aproximadamente 95% para obtener un extracto bruto, y se puede utilizar una solución de etanol del 70% ~ 95% adicionalmente en una cromatografía a fin de eluir y aislar un extracto con enriquecimiento de la actividad antiartrítica.

En otra divulgación, se puede usar una solución de etanol de aproximadamente 95% para obtener un extracto bruto, y se puede utilizar hexano adicionalmente en una cromatografía en fase normal a fin de eluir y aislar un extracto con enriquecimiento de la actividad antiartrítica.

El proceso de extracción como se describe en este documento puede llevarse a cabo con otros procedimientos apropiados de condensación o de purificación, por ejemplo, la condensación en seco, condensación de descompresión y liofilización.

Según esta invención, las pruebas en las ratas con artritis demuestran que el extracto de la presente invención tiene enriquecimiento de la actividad antiartrítica. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona además un método para prevenir o tratar la artritis que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz del extracto tal como se describe en este documento.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para uso en la prevención o tratamiento de la artritis que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del extracto con enriquecimiento de la actividad antiartrítica como se describe en este documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una cantidad eficaz del extracto con enriquecimiento de la actividad antiartrítica en una composición farmacéutica de esta invención para el tratamiento de la artritis es de 0,5 ~ 10 g/día.

5 La ruta y dosis más adecuada para el tratamiento serán determinadas fácilmente por los expertos en la técnica. La dosis dependerá de la naturaleza y estado de los síntomas a tratar, edad y condición física general del paciente a tratar, la vía de administración y cualquier terapia practicada previamente.

El término "vehículo" o "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en este documento, se refiere a los diluyentes, excipientes, agentes aceptables o similares que son bien conocidos por los expertos normales en la técnica y se pueden utilizar en la preparación de una composición farmacéutica .

10 La composición de la invención se puede entregar a través de cualquier ruta médicamente aceptable, tal como por vía oral, parenteral, es decir intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, transdérmica, por vía rectal o por inhalación, o por vía vaginal, ocular o nasal. La composición farmacéutica entregada por vía parenteral puede estar en cualquier forma que se desee, incluyendo pero no limitado a, una solución, suspensión, emulsión, y composición inyectable sólida que es capaz de ser disuelta o suspendida en un disolvente inmediatamente después de su uso. La solución inyectable puede prepararse resolviendo, suspendiendo o emulsionando uno o más agentes 15 activos en un diluyente. Algunos ejemplos de dicho diluyente son el agua destilada para inyección, solución salina, aceites minerales, alcoholes, y una combinación de los mismos. La solución inyectable puede contener también estabilizadores, disolventes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, agentes suavizantes, tampones, conservantes y otros. La solución inyectable se prepara mediante la esterilización en la etapa de preparación final o por procedimientos estériles. La composición farmacéutica de la invención también se puede preparar en forma de preparaciones sólidas estériles mediante, por ejemplo, la liofilización, y puede ser esterilizada inmediatamente antes de su uso o disuelta en agua estéril para inyectables u otros diluyentes estériles. 20

La composición farmacéutica de la presente invención puede también entregarse por vía oral, la forma de la cual puede ser sólida o líquida. Las composiciones sólidas incluyen comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos y similares. Las composiciones orales también incluyen gárgaras y pastillas. Las cápsulas incluyen cápsulas duras y blandas. En tales composiciones sólidas orales, se pueden utilizar uno o más compuestos activos solos o en combinación con diluyentes, agentes quelantes, agentes disgregantes, lubricantes, estabilizantes, y co-disolventes, para formar preparaciones posteriormente por métodos conocidos. Cuando sea necesario, tales preparaciones se pueden recubrir con un agente de recubrimiento, o dos o más agentes de recubrimiento. En otro aspecto, las composiciones líquidas orales incluyen soluciones líquidas farmacéuticamente aceptables, suspensiones, emulsiones, jarabes, vinos medicados, y similares. En tales composiciones, pueden disolverse, suspenderse o emulsionarse uno o más compuestos activos en un diluyente universal (por ejemplo, agua purificada, etanol o una combinación de los mismos). Excepto para este diluyente, la composición anterior también puede contener agentes humectantes, agentes de suspensión, emulsionantes, edulcorantes, agentes aromatizantes, especias, conservantes, tampones y similares. 25

30 Los ejemplos específicos a continuación se deben interpretar como meramente ilustrativos, y no limitativos del resto de la divulgación en modo alguno. Sin más elaboración, se cree que un experto en la técnica puede, basándose en la descripción en este documento, utilizar la presente invención en su amplitud más completa. 35

### Ejemplos de Preparación

Ejemplo 1 Extracto aislado con una solución de etanol al 50% ~ 95% (ilustrativo)

40 Extracción preliminar:

Se extrajo una cantidad apropiada de *Plectranthus amboinicus* seco con una solución de etanol al 95% para obtener un primer filtrado. A continuación, se filtró el primer filtrado para obtener, además, un residuo, que a su vez se extrajo de nuevo en solución de etanol al 95% para obtener un segundo filtrado. Posteriormente, el primero y el segundo filtrados se combinaron y se condensaron a 1/20 de su volumen original a presión reducida para producir un licor condensado. 45

Cromatografía de columna:

El licor condensado resultante se separó con una columna HP-20. En pocas palabras, el licor condensado mezclado a fondo con agua purificada por ósmosis inversa se introdujo en la columna, seguido del pasaje a través de la columna de cuatro veces el volumen de la columna de agua purificada por ósmosis inversa para recoger un primer eluato. Entonces, se recogió un segundo eluato mediante el pasaje a través de la columna de cuatro veces el volumen de la columna de una solución compuesta de agua purificada por ósmosis inversa y etanol al 95% en una proporción de 1:1 (v/v). A continuación, se condensó el segundo eluato a presión reducida y se liofilizó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus*, designado como ON-024, es decir, una muestra de control extraída en solución de etanol al 0% ~ 50%. 50

55 Posteriormente, se recogió un tercer eluato pasando a través de la columna una solución de etanol al 95% de cuatro veces el volumen de la columna, después de lo cual se condensó a presión reducida y se liofilizó para producir un

extracto de *Plectranthus amboinicus*, designado como ON-025, es decir, un extracto aislado mediante una solución de etanol al 50% ~ 95%.

Además, se recogió un cuarto eluato pasando posteriormente a través de la columna acetato de etilo, después de lo cual se condensó a presión reducida y se liofilizó para obtener un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado con acetato de etilo.

Ejemplo 2 Extracto aislado con una solución de etanol al 50% ~ 95% (ilustrativo)

Cromatografía de columna:

El licor condensado obtenido como se preparó en la extracción preliminar del Ejemplo 1 se separó con una columna HP-20. En pocas palabras, el licor condensado mezclado a fondo con agua purificada por ósmosis inversa se cargó en la columna, seguido del pasaje a través de la columna de dos veces el volumen de la columna de agua purificada por ósmosis inversa para recoger un primer eluato. Después, se recogió un segundo eluato mediante el pasaje a través de la columna de dos veces el volumen de la columna de una solución compuesta de agua purificada por ósmosis inversa y etanol al 95% en una proporción de 1:1 (v/v). A continuación, se condensó el segundo eluato a presión reducida y se liofilizó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus*, designado como ON-022.

Posteriormente, se recogió un tercer eluato pasando a través de la columna una solución de etanol al 95% de dos veces el volumen de la columna, después de lo cual se condensó a presión reducida y se liofilizó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus*, designado como ON-023, es decir, un extracto aislado mediante una solución de etanol al 50% ~ 95%.

Además, se recogió un cuarto eluato pasando posteriormente a través de la columna cuatro veces el volumen de la columna de acetato de etilo, después de lo cual se condensó a presión reducida y se liofilizó para obtener un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado con acetato de etilo.

Ejemplo 3 Extracto aislado con una solución de etanol al 70% ~ 95% (ilustrativo)

El licor condensado obtenido como se preparó en la extracción preliminar del Ejemplo 1 se separó con una columna HP-20. En pocas palabras, el licor condensado mezclado a fondo con agua purificada por ósmosis inversa se cargó en la columna, seguido del pasaje a través de la columna de cuatro veces el volumen de la columna de agua purificada por ósmosis inversa para recoger un primer eluato. Después, se recogió un segundo eluato mediante el pasaje a través de la columna de cuatro veces el volumen de la columna de una solución compuesta de agua purificada por ósmosis inversa y etanol al 95% en una proporción de 3:7 (v/v). El segundo eluato se condensó a presión reducida y se liofilizó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus*, designado como ON-065.

Posteriormente, se recogió un tercer eluato pasando a través de la columna una solución de etanol al 95% cuatro veces el volumen de la columna, después de lo cual se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus*, designado como ON-066, es decir, un extracto aislado mediante una solución de etanol al 70% ~ 95%.

Además, se recogió un cuarto eluato pasando posteriormente a través de la columna cuatro veces el volumen de la columna de acetato de etilo, después de lo cual se condensó a presión reducida y se secó para obtener un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado con acetato de etilo.

Ejemplo 4 Extracto aislado por cromatografía en fase normal

Extracción preliminar:

Se extrajo una cantidad apropiada de *Plectranthus amboinicus* seco con una solución de etanol al 95% para obtener un primer filtrado. Se filtró entonces el primer filtrado para obtener, además, un residuo, que a su vez se extrajo de nuevo en solución de etanol al 95% para obtener un segundo filtrado. Posteriormente, el primero y segundo filtrado se combinaron y se condensaron a presión reducida para producir un licor condensado. Dicho licor condensado se mezcló entonces con gel de sílice, seguido de condensación a presión reducida y se secó para producir un extracto bruto unido al gel ("CE-gel").

Cromatografía en columna:

Se utilizó gel de sílice en un peso igual al del *Plectranthus amboinicus* seco para llenar la columna mediante el uso de hexano, después de lo cual la columna llena se cubrió adicionalmente con el CE-gel preparado como se describió anteriormente. Se utilizó seis veces el volumen de la columna de hexano para eluir la columna a fin de obtener un primer eluato, que después se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado con hexano, designado como ON-078.

Posteriormente, se recogió un segundo eluato pasando a través de la columna una solución de hexano/acetato de etilo, seis veces el volumen de la columna, en una proporción de 1:1 (v:v). El segundo eluato resultante se condensó

a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado con hexano/acetato de etilo, designado como ON-079.

Además, se recogió un tercer eluato pasando posteriormente a través de la columna acetato de etilo, seis veces el volumen de la columna. El tercer eluato obtenido se condensó a presión reducida y se secó para obtener un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado con acetato de etilo, designado como ON-083.

Se recogió un cuarto eluato mediante el paso posterior a través de la columna de seis veces el volumen de la columna de solución de acetato de etilo/metanol en una proporción de 1:1 (v/v). El cuarto eluato resultante se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado con acetato de etilo/metanol, designado como ON-084.

Se recogió un eluato final mediante el paso posterior a través de la columna de cuatro veces el volumen de la columna de metanol. El eluato final resultante se condensó bajo presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado por metanol, designado como ON-085.

Ejemplo 5 Extracto aislado por cromatografía de fase normal

Se llevó a cabo una cromatografía en columna como se describe en el Ejemplo 4 para obtener ON-078.

Posteriormente, se recogió un segundo eluato pasando a través de la columna dos veces el volumen de la columna de solución de hexano/acetato de etilo en una proporción de 1:1 (v:v). El segundo eluato resultante se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado mediante hexano/acetato de etilo, designado como ON-080.

Además, se recogió un tercer eluato posteriormente mediante el paso a través de la columna de cuatro veces el volumen de la columna de solución de hexano/acetato de etilo en una proporción de 1:1 (v:v). El tercer eluato resultante se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado mediante hexano/acetato de etilo, designado como ON-092.

Se recogió un eluato final mediante el paso adicional a través de la columna de seis veces el volumen de la columna de acetato de etilo. El eluato final resultante se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado mediante acetato de etilo, designado como ON-083.

Ejemplo 6 Extracto aislado por cromatografía en fase normal

Se llevó a cabo una cromatografía en columna como se describe en el Ejemplo 4 para la obtención de ON-078.

Posteriormente, se recogió un segundo eluato mediante el paso a través de la columna de dos veces el volumen de la columna de solución de hexano/acetato de etilo en una proporción de 1:1 (v:v). El segundo eluato resultante se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado mediante hexano/acetato de etilo, designado como ON-080.

Además, se recogió un tercer eluato posteriormente mediante el paso a través de la columna de dos veces el volumen de la columna de solución de hexano/acetato de etilo en una proporción de 1:1 (v:v). El tercer eluato resultante se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado mediante hexano/acetato de etilo, designado como ON-081.

Se recogió un cuarto eluato posteriormente mediante el paso a través de la columna de dos veces el volumen de la columna de solución de hexano/acetato de etilo en una proporción de 1:1 (v:v). El cuarto eluato resultante se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado mediante hexano/acetato de etilo, designado como ON-082.

Se recogió posteriormente un quinto eluato mediante el paso a través de la columna de seis veces el volumen de la columna de hexano. El quinto eluato resultante se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado mediante hexano, designado como ON-083.

Se recogió posteriormente un sexto eluato mediante el paso a través de la columna de seis veces el volumen de la columna de solución de hexano/metanol en una proporción de 1:1 (v:v). El sexto eluato resultante se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado mediante hexano/metanol, designado como ON-084.

Se recogió un eluato final mediante el paso posterior a través de la columna de cuatro veces el volumen de la columna de metanol. El eluato final resultante se condensó a presión reducida y se secó para obtener un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado mediante metanol, designado como ON-085.

Ejemplo 7 Extracto aislado mediante cromatografía en fase normal

Se llevó a cabo una cromatografía en columna como se describe en el Ejemplo 4 para la obtención de ON-078.



Posteriormente, se recogió un segundo eluato mediante el paso a través de la columna de seis veces el volumen de la columna de solución de hexano/acetato de etilo en una proporción de 9:1 (v:v). Se recogió un tercer eluato mediante el paso a través de la columna de seis veces el volumen de la columna de solución de hexano/acetato de etilo en una proporción de 1:1 (v:v). El tercer eluato resultante se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado mediante hexano/acetato de etilo, designado como ON-086.

#### Ejemplo 8 Extracto aislado por cromatografía en fase normal

Se llevó a cabo una cromatografía en columna como se describe en el Ejemplo 4 para la obtención de ON-078.

Posteriormente, se recogió un segundo eluato mediante el paso a través de la columna de seis veces el volumen de la columna de solución de hexano/acetato de etilo en una proporción de 8:2 (v:v). El segundo eluato resultante se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado mediante hexano/acetato de etilo, designado como ON-087.

Se recogió posteriormente un eluato final mediante el paso a través de la columna de seis veces el volumen de la columna de solución de hexano/acetato de etilo en una proporción de 1:1 (v:v). El eluato final resultante se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus*, designado como ON-088.

#### Ejemplo 9 Extracto aislado por cromatografía en fase normal

Se llevó a cabo una cromatografía en columna como se describe en el Ejemplo 4 para la obtención de ON-078.

Posteriormente, se recogió un segundo eluato mediante el paso a través de la columna de seis veces del volumen de la columna de solución de hexano/acetato de etilo en una proporción de 7:3 (v:v). El segundo eluato resultante se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado mediante hexano/acetato de etilo, designado como ON-089.

Se recogió un eluato final mediante el paso posterior a través de la columna de seis veces del volumen de la columna de solución de hexano/acetato de etilo en una proporción de 1:1 (v:v). El eluato final resultante se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus*, designado como ON-090.

#### Ejemplo 10 Extracto aislado por cromatografía en fase normal

Se llevó a cabo una cromatografía en columna como se describe en el Ejemplo 4 para la obtención de ON-078.

Posteriormente, se recogió un segundo eluato mediante el paso a través de la columna de seis veces el volumen de la columna de solución de hexano/acetato de etilo en una proporción de 6:4 (v:v). El segundo eluato resultante se condensó a presión reducida y se secó para producir un extracto de *Plectranthus amboinicus* aislado mediante hexano/acetato de etilo, designado como ON-091.

Se analizaron además los extractos de ON-024 (un extracto aislado mediante una solución de etanol de 0% ~ 50%), ON-025 (un extracto aislado mediante una solución de etanol de 50% ~ 95%), ON-066 (un extracto aislado mediante una solución de etanol de 70% ~ 95%), y ON-080 (un extracto aislado mediante una cromatografía de fase normal) por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con un detector a longitudes de onda de 200 nm y 320 nm. Como resultado, se encontró que el patrón de HPLC de ON-024 era diferentes a los encontrados para ON-025 (un extracto aislado mediante una solución de etanol de 50% ~ 95%), ON-066 (un extracto aislado mediante una solución de etanol de 70% ~ 95%) y ON-080 (un extracto aislado mediante una cromatografía en fase normal):

(1) El patrón de HPLC de ON-024 detectado a una longitud de onda de 200 nm mostró seis picos de absorción en tiempos de retención de 13, 20, 21, 27, 37 y 39 minutos (Figura 1); y a una longitud de onda de 320 nm se detectó un pico de absorción de ácido cafeico en un tiempo de retención de 13 minutos, un pico de absorción de ácido rosmarínico a 27 minutos, y un pico de absorción a 35 minutos (Figura 2).

(2) El patrón de HPLC de ON-025 detectado a una longitud de onda de 200 nm mostró un pico de absorción en un tiempo de retención de 45 min, y un pico de absorción de carvacrol a 55 minutos (Figura 3); y el detectado a una longitud de onda de 320 nm mostró ocho picos de absorción a un tiempo de retención de 39 a 43 minutos y un pico de absorción de cirsimaritin a 45 minutos (Figura 4).

(3) El patrón de HPLC de ON-066 detectado a una longitud de onda de 200 nm mostró un pico de absorción de cirsimaritin a un tiempo de retención de 45 minutos y un pico de absorción de carvacrol a 55 minutos (Figura 5); y el detectado a una longitud de onda de 320 nm mostró un pico de absorción de cirsimaritin a un tiempo de retención de 45 minutos y un pico de absorción de salvigenin a 62 minutos (Figura 6).

(4) El patrón de HPLC de ON-080 detectado a una longitud de onda de 200 nm mostró un pico de absorción de carvacrol a un tiempo de retención de 55 minutos (Figura 7); y el detectado a una longitud de onda de 320 nm mostró tres picos de absorción a un tiempo de retención de 18 a 21 minutos, tres picos de absorción a 37-41 minutos, dos picos de absorción a 43-45 minutos, un pico de absorción de cirsimaritin a 45 minutos, cuatro picos de absorción a 50-54 minutos, y un pico de absorción de salvigenin a 62 minutos (Figura 8).

**Ejemplos de eficacia**

## Ejemplo 1 Modelos animales con artritis inducida por adyuvante completo de Freund

Se utilizaron grupos de 6 ratas Lewis hembras con pesos de  $170 \pm 10$  g. Se inyectó con adyuvante completo de Freund (CFA), una suspensión bien crecida de *Mycobacterium butyricum* matado (0,3 mg en 0,1 ml de aceite mineral ligero), en una dosis única en la región subplantar de la pata trasera derecha (denominado Día 1). Una hora antes de la inyección de CFA, se administró el vehículo (carboximetilcelulosa al 1%, 10 ml/kg) o los compuestos de ensayo a 500 mg/kg a los animales por sonda oral (PO). Las administraciones se llevaron a cabo dos veces al día durante 5 días consecutivos. Los volúmenes de las patas traseras izquierdas se midieron por un pletismómetro el Día 0 (antes del tratamiento de CFA), el Día 14, Día 18 y Día 21. Se comparó después la hinchazón neta de cada grupo de tratamiento con el grupo tratado con el vehículo y se expresó como porcentaje de inhibición. Una inhibición del 30% o más en el volumen de la pata con respecto al control tratado con vehículo se consideró actividad antiartrítica significativa. El extracto administrado a cada grupo y los resultados correspondientes se muestran también en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Actividad inhibitoria con relación al grupo de control

Tratamiento	Dosis	Inhibición con relación al vehículo control (%)		
		Día 14	Día 18	Día 21
ON-022	500 mg/kg, bid x 5, PO	12	21	16
ON-023	500 mg/kg, bid x 5, PO	44*	55*	53*
ON-024	500 mg/kg, bid x 5, PO	24	15	27
ON-025	500 mg/kg, bid x 5, PO	56*	53*	46*
ON-026	500 mg/kg, bid x 5, PO	29	22	3
ON-065	500 mg/kg, bid x 5, PO	24	14	23
ON-066	500 mg/kg, bid x 5, PO	45*	42*	48*
ON-080	500 mg/kg, bid x 5, PO	36*	42*	42*

\*" indica actividad antiartrítica significativa.

Como se muestra en la Tabla 1, los extractos de la presente invención están enriquecidos con actividad antiartrítica, en particular, los extractos ON-023, ON-025, ON-066 y ON-080.

## Ejemplo 2 Actividad antiinflamatoria

## 20 Experimentos

## (A) Cultivo de células

Se diluyeron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de la sangre de donantes adultos sanos y se aislaron por centrifugación en gradiente Ficoll-Paque (FP) (Amersham Biosciences) a 600 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las PBMCs aisladas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato, se resuspendieron en suero fetal bovino (FBS) al 10% inactivado por calor, y se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos con una densidad de  $2,0 \times 10^5$  células por pocillo para evaluar la actividad antiartrítica de los extractos tal como se describe en el presente documento.

## (B) Inhibición de la proliferación de PMBCs inducida por PHA

La proliferación de PBMCs inducida por PHA fue utilizada como una plataforma técnica para la evaluación de la eficacia antiinflamatoria de diversos extractos de la presente invención. PBMCs humanas fueron cocultivadas con PHA a una concentración final de 5  $\mu$ g/ml y varios extractos de *Plectranthus amboinicus* a una concentración final de 0 ~ 90 mg/ml durante 3 días. PBMCs tratadas con dexametasona (DEX) antes de la estimulación por PHA (5 mg/ml) también se incluyeron en el experimento como muestras de control positivo. Después las células se incubaron

5 durante 3 días a 37° C con aire húmedo que contenía 5% de CO<sub>2</sub>, y se llevaron a cabo ensayos con (metiltiazoliltetrazolio, MTT) para evaluar la tasa de proliferación de PBMCs. PBMCs sin tratamiento de PHA fueron utilizadas como muestras de control negativo. La absorbancia de cada pocillo se detectó mediante un colorímetro fotoeléctrico a longitud de onda de 540 nm. La intensidad del color era proporcional al grado de proliferación celular; y por lo tanto se puede utilizar para calcular la actividad de inhibición de cada extracto. Se realizaron tres experimentos independientes, y los datos determinados por ensayos de MTT se expresaron además como IC<sub>50</sub>.

10 Como se muestra en las Tablas 2 y 3, se encontró que los extractos de *Plectranthus amboinicus* proporcionados por la presente invención eran todos capaces de inhibir la proliferación de linfocitos inducida por PHA de una manera dependiente de la dosis. La citotoxicidad de los extractos para las células (sin tratamiento de PHA) también se determinó por ensayos de MTT. Como resultado, ON-023 (40 µg/ml) mostró actividad completa de inhibición de la proliferación de los linfocitos inducida por PHA sin citotoxicidad; por el contrario, ON-022 (40 µg/ml) mostró solamente actividad parcial de inhibición (~ 50%) de la proliferación de linfocitos inducida por PHA.

Tabla 2

15 Inhibición de la proliferación de PMBCs inducida por PHA por diversos extractos (los datos se determinaron mediante ensayos de MTT)

Muestra	Concentración de la muestra (µg/ml)					
	1,25	2,5	5	10	20	40
Ejemplo 2_ON-022	0,589	0,536	0,513	0,520	0,511	0,405
Ejemplo 2_ON-023	0,649	0,637	0,559	0,533	0,426	0,154
Ejemplo 1_ON-024	0,651	0,591	0,603	0,576	0,504	0,231
Ejemplo 1_ON-025	0,740	0,749	0,744	0,703	0,611	0,374
Ejemplo 3_ON-065	0,570	0,534	0,518	0,485	0,383	0,151
Ejemplo 3_ON-065	0,580	0,522	0,457	0,357	0,301	0,190
Grupo de control negativo (sin PHA)	0,245					
<b>PHA</b>	<b>0,634</b>					
DEX	0,1 µM					
	0,242					

Tabla 3

Inhibición de la proliferación de PMBCs inducida por PHA por diversos extractos (los datos se determinaron mediante ensayos de MTT y se expresan como IC<sub>50</sub>)

Muestra	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
ON-022	36,1
ON-023	11,6
ON-024	22,2
ON-025	21,5
ON-065	15,5
ON-066	6,1
ON-078	> 50
ON-079	<5,6
ON-080	11,6

Muestra	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
ON-081	40,7
ON-082	8,5
ON-083	> 55,5
ON-084	> 55,5
ON-085	> 55,5
ON-086	32
ON-087	7,1
ON-088	39,3
ON-089	14,2
ON-090	27,7
ON-091	12,3

(C) Producción y medición de citoquinas inducidas por PHA

5 En el Día 3, se recogió el sobrenadante celular, se dividió, y almacenó a -20° C hasta su análisis. Las cantidades de TNF-α, interleucina IL-6, IFN-γ, e IL-5 en el sobrenadante se midieron usando kits Quantikine ELISA (R & D Systems, Mineapolis, MN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los niveles de citoquinas en el medio de cultivo, ya fuera liberadas de forma espontánea o inducidas por PHA, se muestran en la Tabla 4. El efecto de cada extracto sobre la producción de citoquinas de PBMCs inducidas por PHA se muestra en las Tablas 5-8. Estos resultados demostraron los efectos antiinflamatorios de los extractos de la presente invención.

10

Tabla 4

Liberación de TNF-α, IL-6, IFN-γ e IL-5 (pg/ml) de PBMCs inducida por PHA

	Concentración de citoquinas (pg/ml)			
	TNF- α	IL-6	IFN-γ	IL-5
Grupo de control (sin PHA)	271,6	157	25,0	37,0
PHA	4031,3	703,0	176,8	161,9
PHA + 0,1µM de DEX	272,5	157	25	37

Tabla 5

15 Inhibición de diversos extractos a la liberación de TNF-α de PBMCs inducida por PHA

Muestra	Concentración de la muestra (µg/ml)			
	5	10	20	40
Ejemplo 2_ON-022	5257,1	4138,9	4129,4	2884,3
Ejemplo 2_ON-023	3807,3	2744,9	881,6	126,0

ES 2 587 507 T3

Muestra	Concentración de la muestra (µg/ml)			
	5	10	20	40
Ejemplo 1_ON-024	1784,0	1549,2	1048,8	126,0
Ejemplo 1_ON-025	3323,6	3053,3	2872,4	683,9
Ejemplo 3_ON-065	1517,4	937,8	251,5	126,0
Ejemplo 3_ON-065	6090,6	6782,1	4445,6	742,4

Tabla 6

Inhibición de diversos extractos a la liberación de IL-6 de PBMCs inducida por PHA

Muestra	Concentración de la muestra (µg/ml)			
	5	10	20	40
Ejemplo 2_ON-022	849,2	567,2	511,8	157,0
Ejemplo 2_ON-023	804,8	1131,5	788,6	157,0
Ejemplo 1_ON-024	466,6	498,4	292,6	157,0
Ejemplo 1_ON-025	1073,1	1205,5	1198,0	363,0
Ejemplo 3_ON-065	421,7	330,5	390,1	157,0
Ejemplo 3_ON-065	4407,3	4693,9	2367,7	196,6

Tabla 7

5

Inhibición de diversos extractos a la liberación de IFN- $\gamma$  de PBMCs inducida por PHA

Muestra	Concentración de la muestra (µg/ml)			
	5	10	20	40
Ejemplo 2_ON-022	169,3	164,2	259,9	89,6
Ejemplo 2_ON-023	42,5	25,0	25,0	25,0
Ejemplo 1_ON-024	43,8	83,4	25,0	25,0
Ejemplo 1_ON-025	143,3	166,1	216,9	25,0
Ejemplo 3_ON-065	79,0	68,7	25,0	25,0
Ejemplo 3_ON-065	667,2	528,2	379,8	25,0

Tabla 8

Inhibición de diversos extractos a la liberación de IL-5 de PBMCs inducida por PHA

Muestra	Concentración de la muestra (ug/ml)			
	5	10	20	40
Ejemplo 2_ON-022	155,3	156,0	127,6	78,9
Ejemplo 2_ON-023	168,5	156,7	115,8	37,0
Ejemplo 1_ON-024	147,7	140,8	117,9	37,0
Ejemplo 1_ON-025	183,1	184,5	228,4	109,5
Ejemplo 3_ON-065	140,8	112,3	74,0	37,0
Ejemplo 3_ON-065	54,4	163,7	185,2	58,6

**REIVINDICACIONES**

1. Un extracto de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng con enriquecimiento de la actividad antiartrítica preparado por un procedimiento que comprende los pasos siguientes:

(a) extraer *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng con una solución alcohólica para obtener un extracto bruto;

5 (b) eluir el extracto bruto por una cromatografía de fase normal usando hexano como un primer disolvente y hexano/acetato de etilo como un segundo disolvente para obtener un eluato del segundo disolvente.

2. Un método para preparar un extracto de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng con enriquecimiento de la actividad antiartrítica que comprende: la extracción de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng seco con una solución alcohólica para obtener un extracto bruto, y la elución del extracto bruto producido por una cromatografía de fase normal usando hexano como un primer disolvente y hexano/acetato de etilo como un segundo disolvente para aislar un extracto con enriquecimiento de la actividad antiartrítica con el segundo disolvente.

10

3. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la artritis que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del extracto tal como se define en la reivindicación 1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 4. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la artritis que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del extracto preparado por el método de la reivindicación 2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. El extracto de la reivindicación 1, en donde la solución alcohólica es etanol al 95%.

6. El método de la reivindicación 2, en donde la solución alcohólica es etanol al 95%.

20

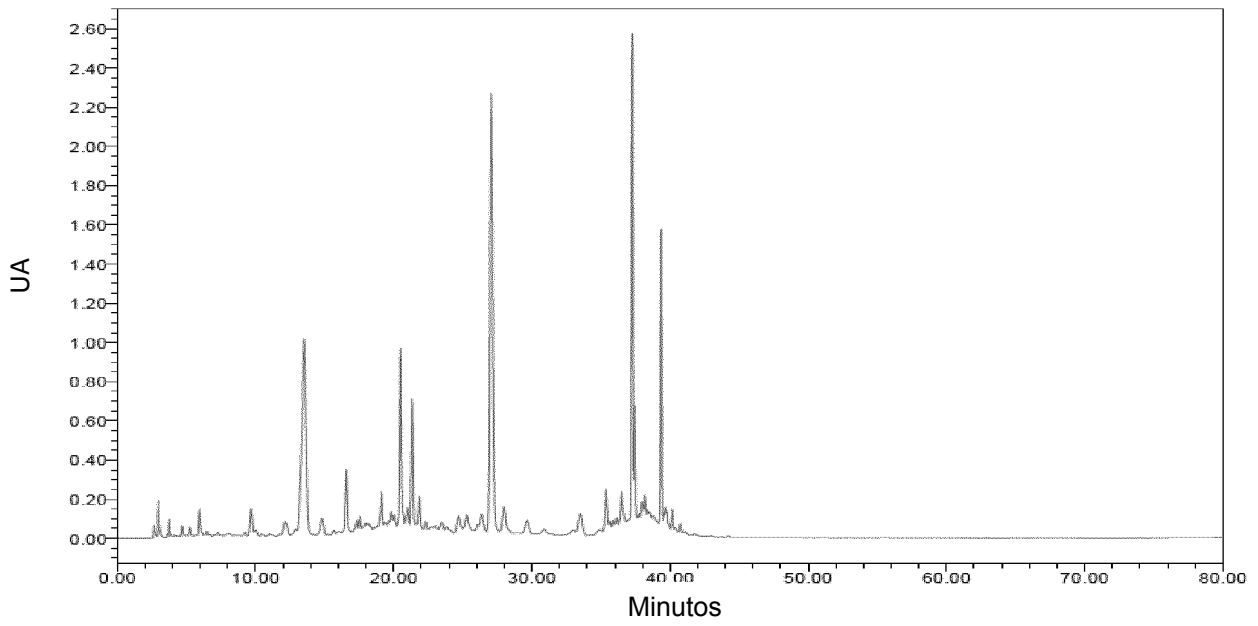


Figura 1

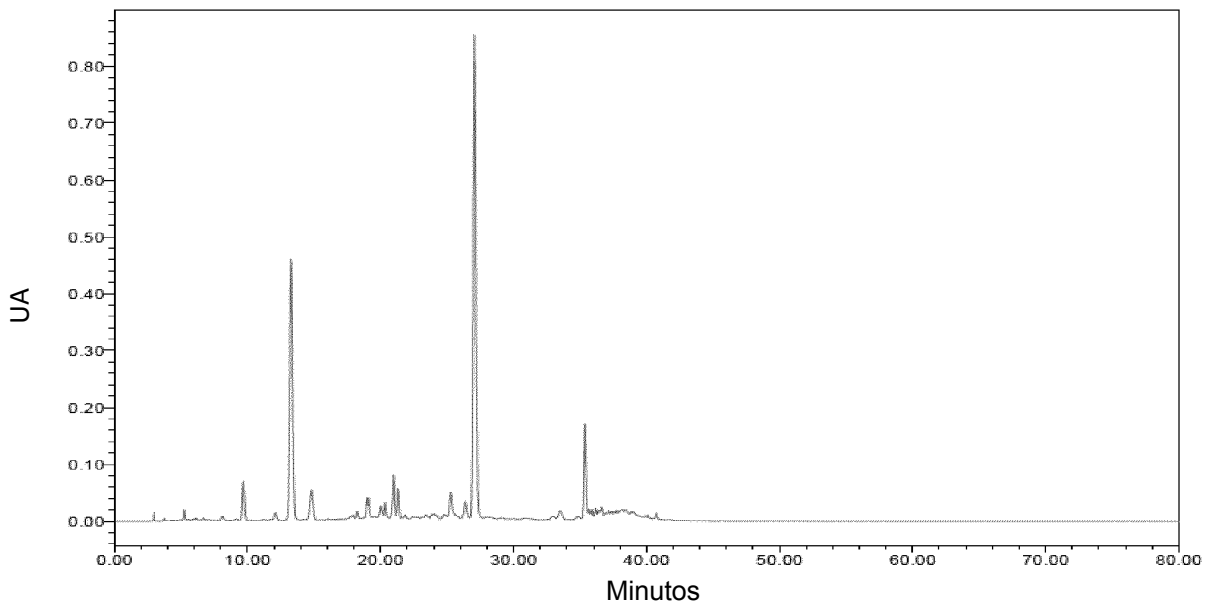


Figura 2



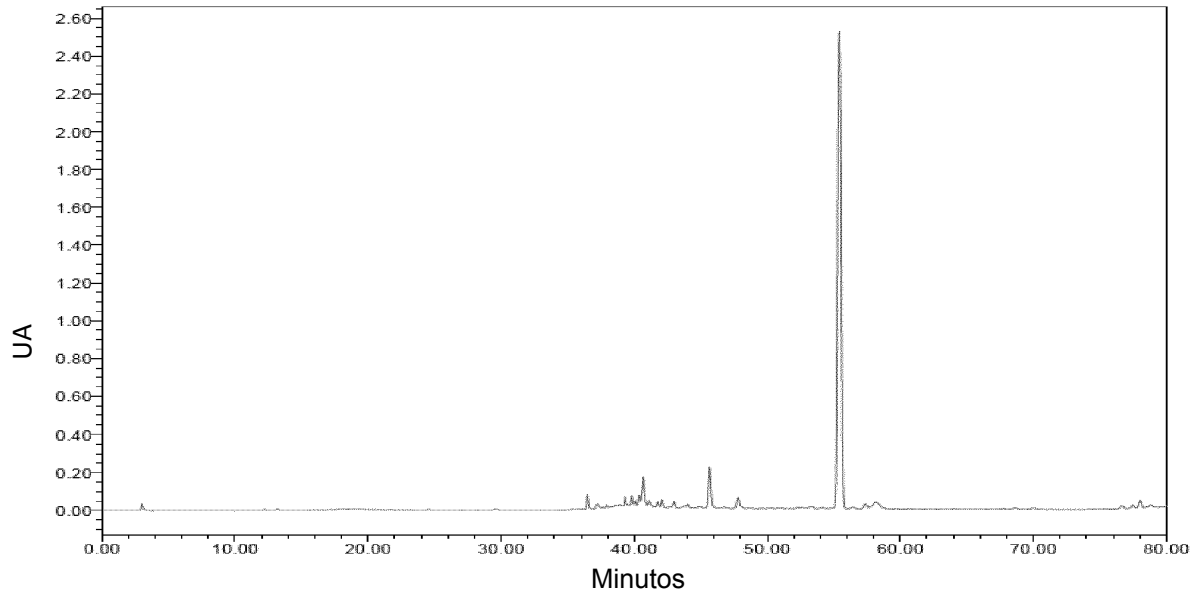


Figura 3

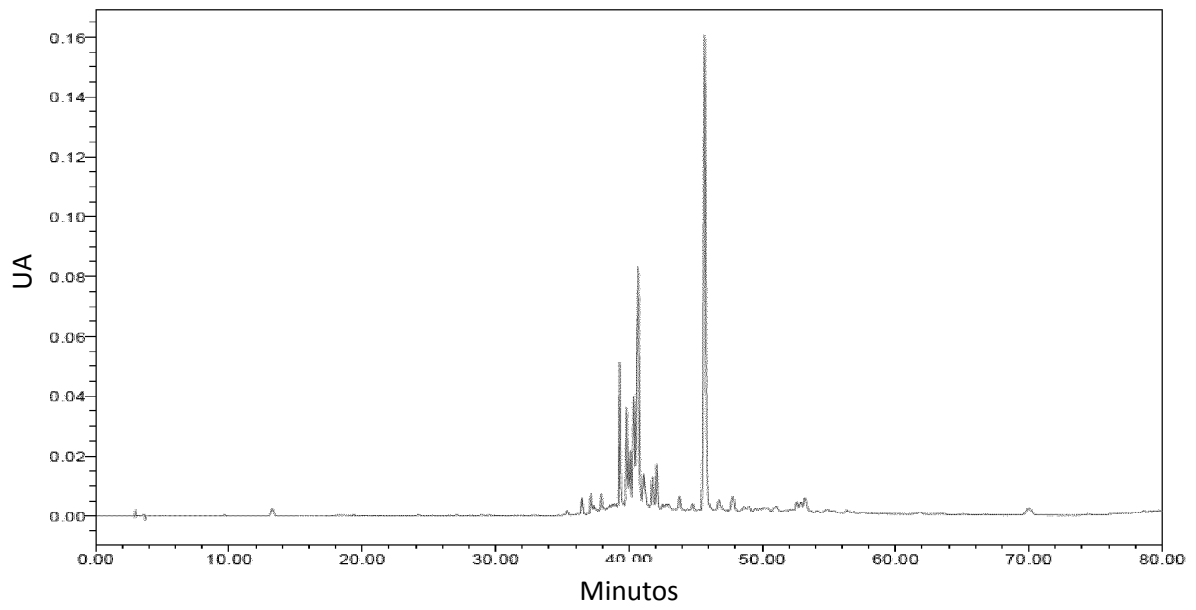


Figura 4

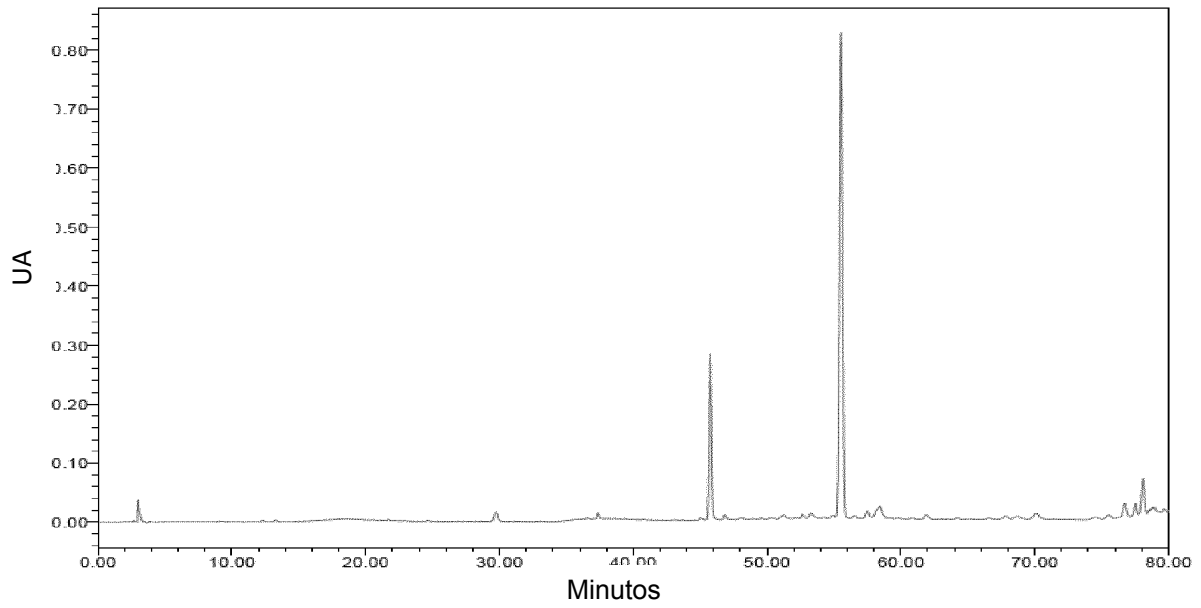


Figura 5

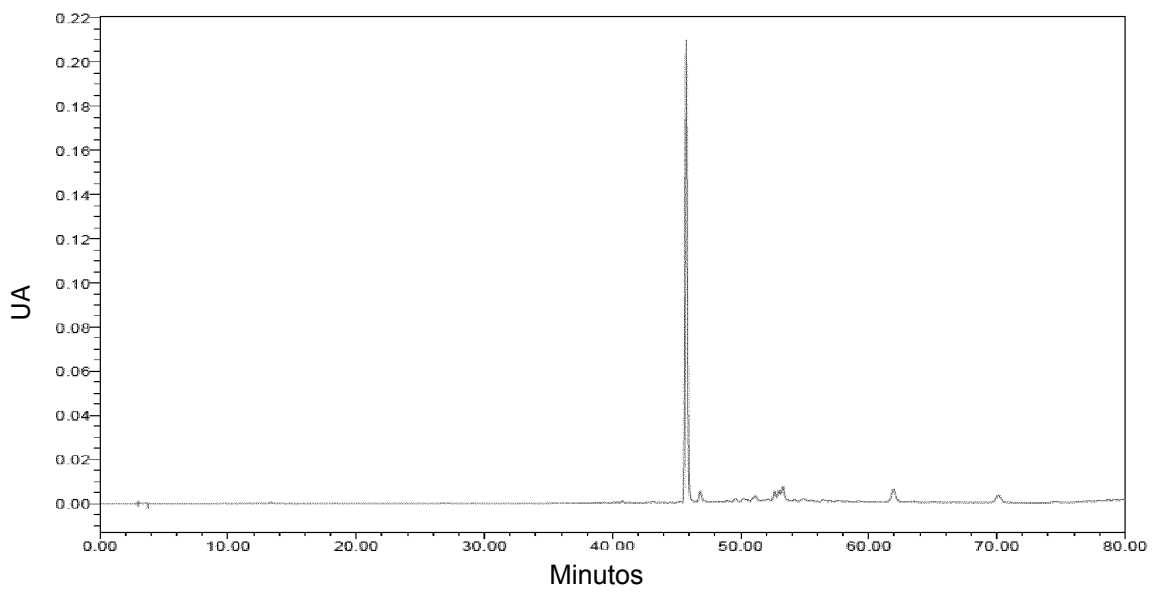


Figura 6

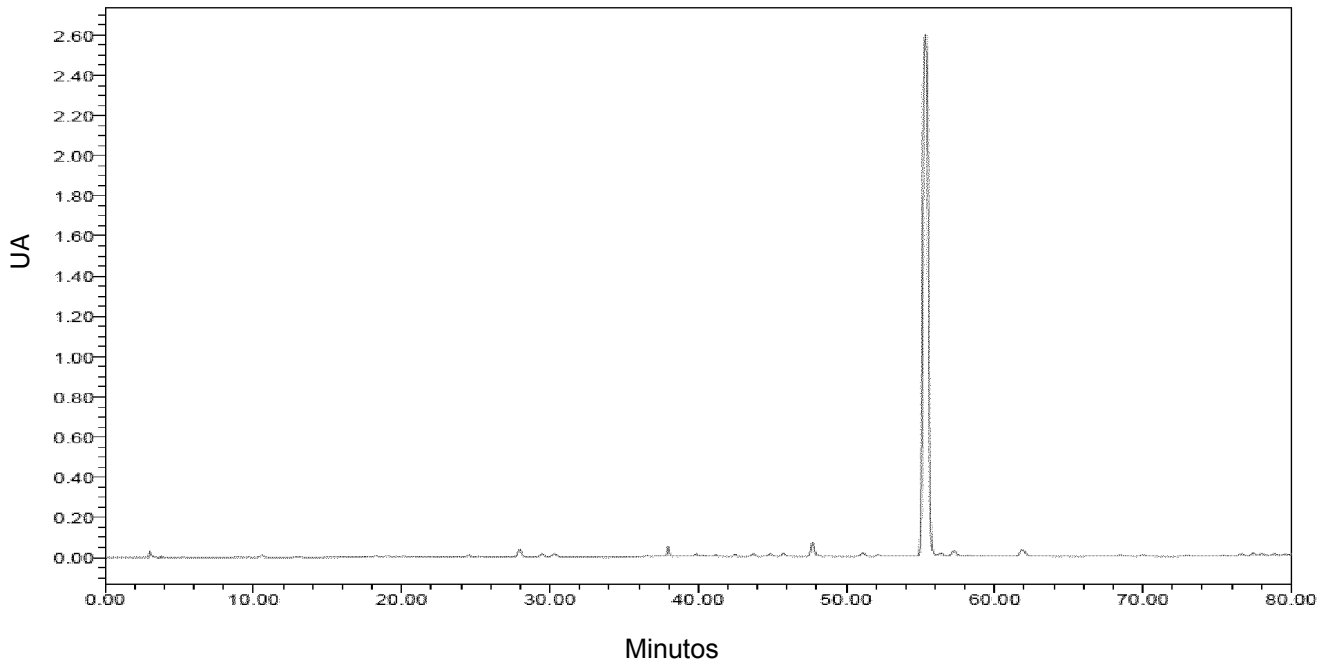


Figura 7

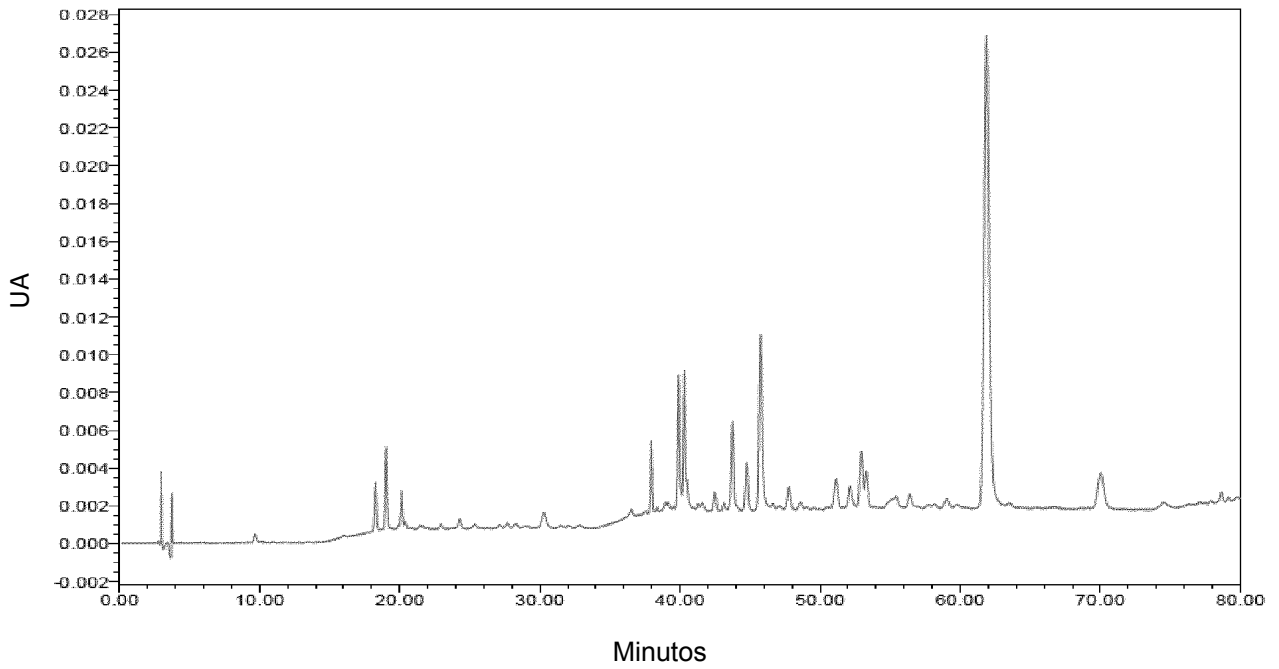


Figura 8