



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0309689-0 B1



(22) Data do Depósito: 30/04/2003

(45) Data de Concessão: 29/06/2021

(54) Título: COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO UMA MISTURA DE FLAVONÓIDES DE ANEL-B-LIVRE E FLAVANOS E USOS DAS MESMAS

(51) Int.Cl.: A61K 31/35.

(30) Prioridade Unionista: 30/04/2002 US 60/377,168.

(73) Titular(es): UNIGEN, INC..

(72) Inventor(es): QI JIA.

(86) Pedido PCT: PCT US2003013463 de 30/04/2003

(87) Publicação PCT: WO 2003/092599 de 13/11/2003

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/10/2004

(57) Resumo: "FORMULAÇÃO DE UMA MISTURA DE FLAVONÓIDES DE ANEL-8-LIVRE E FLAVANOS COMO AGENTE TERAPÊUTICO". A presente invenção refere-se a uma nova composição de material, que consiste em uma mistura de duas classes específicas de compostos - flavonóides de anel-B-Livre e flavanos - para uso na prevenção e tratamento e estado mediados pelos caminhos de COX-2 e 5-LO. A presente invenção refere-se, ainda, a um novo método para inibir, simultaneamente, as enzimas ciclooxigenase-2 (COX-2 e 5-lipoxigenase (5-LO), e reduzir a produção de mRNA de cox 2. Finalmente, a presente invenção inclui um método para perda de peso e controle de glicose no sangue. Os métodos da presente invenção consistem em administrar a um hospedeiro que necessite da mesma uma quantidade eficaz da composição da presente invenção, junto com um veículo farmaceuticamente aceitável. A presente invenção refere-se, em geral, à prevenção e tratamento de doenças e estados mediados pelos caminhos de ciclooxigenase-2 (COX-2) e 5-lipoxigenase (5-LO), inclusive, mas não-limitados ao alívio do desconforto e dor associados a estados, tais como osteoartrite, artrite reumatóide e outras lesões que resultam de uso excessivo.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO UMA MISTURA DE FLAVONÓIDES DE ANEL-B-LIVRE E FLAVANOS E USOS DAS MESMAS"**.

ÁREA DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se refere, em geral, à prevenção e tratamento de doenças e condições mediadas pelos caminhos de ciclooxigenase-2 (COX-2) e 5-lipoxigenase (5-LO). Especificamente, a presente invenção se refere a uma nova composição de material que consiste em uma mistura de uma combinação de duas classes específicas de compostos - flavonóides de anel-B-Livre e flavanos - para uso na prevenção e tratamento de doenças e estados mediados pelos caminhos de COX-2 e 5-LO. Está incluído na presente invenção um método para a inibição simultânea da função de proteína das enzimas COX-2 e 5-LO, e um método para modular a produção de mRNA pela administração da nova composição desta invenção. Também está incluído na presente invenção um método para a prevenção e tratamento de doenças e condições mediadas por COX-2 e 5-LO, inclusive, mas não-limitados a, desconforto e dor nas juntas, associados a condições tais como osteoartrite, artrite reumatóide, e outras lesões que resultam de uso excessivo. Está incluído ainda na presente invenção um método para reduzir níveis de glicose no sangue e causar a perda de peso.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] A liberação e metabolismo de ácido araquidônico (AA) da membrana celular resulta na geração de metabólitos pró-inflamatórios por diversos caminhos diferentes. Discute-se que dois dos caminhos mais importantes para a inflamação são mediados pelas enzimas 5-lipoxigenase (5-LO) e ciclooxigenase (COX). Esses caminhos paralelos resultam na geração de leucotrienos e prostaglandinas, respectivamente, que desempenham importantes papéis no início e progresso

da resposta inflamatória. Esses compostos vasoativos são quimiotaxinas, que causam infiltração de células inflamatórias nos tecidos e servem para prolongar a resposta inflamatória. Conseqüentemente, as enzimas responsáveis pela geração desses mediadores de inflamação tornaram-se alvos para muitas das novas drogas voltadas para o tratamento de inflamação, que contribui para a patogênese de doenças, tal como artrite reumatóide, osteoartrite, mal de Alzheimer e determinados tipos de câncer.

[003] A inibição da enzima ciclooxigenase (COX) é o mecanismo de ação atribuído à maioria das drogas antiinflamatórias não-esteroidais (NSAIDs). Há duas isoformas distintas da enzima COX (COX-1 e COX-2), que compartilham aproximadamente 60% da homologia de sequência, mas diferem nos perfis de expressão e função. COX-1 é uma forma constitutiva da enzima, que tem sido ligada à produção de prostaglandinas fisiologicamente importantes envolvidas na regulação de funções fisiológicas normais, tais como agregação de plaquetas, proteção da função celular no estômago e conservação da função normal dos rins (Dannhardt and Kiefer (2001) Eur. J. Med. Chem. 36:109-26). A segunda isoforma, COX-2, é uma forma da enzima que é indutível por citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-1 β (IL-1 β) e outros fatores de crescimento (Herschmann (1994) Cancer Metastasis Ver. 134:241-56; Xie et al. (1992) Drugs Dev. Res. 25:249-65). Essa isoforma catalisa a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) de AA. A inibição de COX-2 é responsável pelas atividades antiinflamatórias de NSAIDs convencionais.

[004] Inibidores que demonstram uma especificidade dual para COX-2 e 5-LO, enquanto conservam a seletividade de COX-2 em relação a COX-1, teriam a vantagem óbvia de inibir múltiplos caminhos de metabolismo de AA. Esses inibidores bloqueariam os efeitos inflamatórios de PGE₂, bem como os de leucotrienos (LT) múltiplos, limitando

sua produção. Isso inclui a vasodilatação, vasopermeabilidade e efeitos quimiotáticos de LTB₄ e LTD₄ e os efeitos de LTE₄, também conhecidos como a substância de reação lenta de anafalaxia. Desses, LTB₄ tem os efeitos quimiotáticos e quimiocinéticos mais potentes (Moore (1985) em *Prostanoids: Pharmacological, Physiological and Clinical Relevance*, Cambridge University Press, N.Y., pp. 229-30) e mostrou ser elevado na mucosa gastrointestinal de pacientes com doença intestinal inflamatória (Sharon and Stenson (1983) *Gastroenterology* 84:1306-13) e dentro do fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (Klicksein et al. (1980) *J. Clin. Invest.* 66:1166-70; Rae et al. (1982) *Lancet* ii:1122-4).

[005] Além das vantagens acima mencionadas de inibidores duais de COX-2/5-LO, muitos inibidores duais não provocam alguns dos efeitos colaterais que são típicos de inibidores de NSAIDs ou COX-2, inclusive o dano gastrointestinal e o desconforto causado pelas NSAIDs tradicionais. Foi sugerido que a inflamação gástrica induzida por NSAID deve-se, em grande parte, aos metabólitos de 5-LO, particularmente, LTB₄, que atrai células para o local de uma lesão gástrica, desse modo causando mais danos (Kircher et al. (1997) *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 56:417-23). Os leucotrienos representam os metabólitos principais de AA dentro da mucosa gástrica, após a inibição de prostanoíde. Parece que esses compostos contribuem para uma quantidade significativa da lesão epitelial gástrica resultante do uso de NSAIDs (Celotti and Laufer (2001) *Pharmacol. Res.* 43:429-36). Foi demonstrado que inibidores duais de COX-2 e 5-LO também inibem a vasoconstrição coronária em corações artríticos em um modelo de rato (Gok et al. (2000) *Pharmacology* 60:41-46). Tomadas em conjunto, essas características sugerem que pode haver vantagens nítidas para inibidores duais de COX-2 e 5-LO sobre inibidores de COX-2 específicos e NSAIDs não-específicas, com relação tanto a

um aumento de eficácia como a uma redução de efeitos colaterais.

[006] Como o mecanismo de ação de inibidores de COX se sobrepõe ao da maioria das NSAIDs, os inibidores de COX são usados para tratar muitos dos mesmos sintomas, tais como a dor e o inchaço associado à inflamação em condições temporárias e em doenças crônicas, nos quais a inflamação desempenha um papel crítico. Condições temporárias incluem o tratamento de inflamação associada a abrasões secundárias, queimadura solar ou dermatite de contato, bem como o alívio da dor associada à tensão e dores de cabeça de enxaqueca e cólicas menstruais. Condições crônicas incluem doenças artríticas, tais como artrite reumatóide e osteoartrite. Embora a artrite reumatóide seja, em grande parte, uma doença auto-imune e osteoartrite é causada pela degradação de cartilagem nas juntas, reduzir a inflamação associada a cada um dos mesmos oferece um aumento significativo na qualidade de vida dos que estão sofrendo dessas doenças (Wienberg (2001) *Immunol. Res.* 22:319-41; Wollhiem (2000) *Curr. Opin. Rheum.* 13:193-201). Como a inflamação é um componente de doenças reumáticas em geral, o uso de inibidores de COX tem se expandido para incluir doenças tais como lupus eritromatoso sistêmico (SLE) (Goebel et al. (1999) *Chem. Res. Tox.* 12:488-500); Patrono et al. (1985) *J. Clin. Invest.* 76:1011-1018) e condições de pele reumáticas, tais como escleroderma. Os inibidores de COX também são usados para o alívio de condições de pele inflamatórias, que não são de origem reumática, tais como psoríase, nas quais reduzir a inflamação resultante da produção excessiva de prostaglandinas pode oferecer uma vantagem direta (Fogh et al. (1993) *Acta Derm. Venereol (Oslo)* 73:191-3).

[007] Além de seu uso como agentes antiinflamatórios, outro papel potencial para inibidores de COX é o tratamento de câncer. A superexpressão de COX-2 foi demonstrada em diversas malignidades humanas e os inibidores de COX-2 mostram ser eficazes no tratamen-

to de animais com tumores de pele, mama e bexiga. Embora o mecanismo de ação não está completamente entendido, a superexpressão de COX-2 mostrou que inibe a apoptose e aumenta a invasividade de tipos de células tumorigênicas (Dempke et al. (2001) J. Can. Res. Clin. Oncol. 127:411-17; Moore and Simmons (2000) Current Med. Chem. 7:1131-44). É possível que a produção intensificada de prostaglandinas, resultante da superexpressão de COX-2, estimule a proliferação celular e, conseqüentemente, aumenta a angiogênese. (Moore (1985) em Prostanoids: Pharmacological, Physiological and Clinical Relevance, Cambridge University Press, N.Y., pp. 229-30); Fenton et al. (2001) Am. J. Clin. Oncol. 24:453-57).

[008] Houve vários estudos clínicos avaliando inibidores de COX-2, para uso potencial na prevenção e tratamento de diferentes tipos de câncer. Em 1999, 130.000 novos casos de câncer colorretal foram diagnosticados nos Estados Unidos. Verificou-se que aspirina, uma NSAID não-específica, reduz a incidência de câncer colorretal em 40-50% (Giovannucci et al. (1995) N. Engl. J. Med. 333:609-614) e a mortalidade em 50% (Smalley et al. (1999) Arch. Intern. Med. 150:161-166). Em 1999, o FDA aprovou o inibidor de COX-2, celecoxib, para uso em FAP (Familiar Adenomatous Polyposis), para reduzir a mortalidade por câncer colorretal. Acredita-se que outros tipos de câncer, com evidência de envolvimento de COX-2, possam ser evitados e/ou tratados com sucesso com inibidores de COX-2, inclusive, mas não restritos a, câncer do esôfago, câncer da cabeça e pescoço, câncer de mama, câncer de bexiga, câncer cervical, câncer de próstata, carcinoma hepatocelular e câncer de pulmão de células não-pequenas (Jaekel et al. (2001) Arch. Otolaryngol. 127:1253-59; Kirschenbaum et al. (2001) Urology 58:127-31; Dannhardt and Kiefer (2001) Eur. J. Med. Chem. 36:109-26). Os inibidores de COX-2 também podem mostrar-se bem sucedidos em evitar câncer de cólon em pacientes de alto risco.

Também há evidências de que os inibidores de COX-2 podem evitar ou até mesmo reverter diversos tipos de cânceres de risco de vida. Até o presente, um número de cinquenta estudos mostram que os inibidores de COX-2 podem evitar tumores pré-malignos e malignos em animais e, possivelmente, evitar também cânceres de bexiga, esôfago e pele. A inibição de COX-2 provou ser uma das mais importantes realizações médicas preventivas do século.

[009] O progresso científico recente identificou correlações entre expressão de COX-2, inflamação geral e a patogênese do Mal de Alzheimer (AD) (Ho et al. (2001) Arch. Neurol. 58:487-92). Em modelos animais, camundongos transgênicos, que superexpressam a enzima COX-2, têm neurônios que são mais suscetíveis a danos. O Instituto Nacional sobre Envelhecimento (NIA) está iniciando um ensaio clínico para determinar se NSAIDs podem retardar a evolução do mal de Alzheimer. Naproxeno (uma NSAID não-seletiva) e rofecoxib (Vioxx, uma NSAID seletiva, específica para COX-2) serão avaliados. Indicações prévias indicaram que a inflamação contribui para o mal de Alzheimer. De acordo com a Associação de Alzheimer e o NIA, aproximadamente 4 milhões de pessoas sofrem de AD nos Estados Unidos e espera-se que esse número aumente para 14 milhões em meados do século.

[010] A enzima COX (também conhecida por prostaglandina H₂ sintase) catalisa duas reações separadas. Na primeira reação, AA é metabolizado para formar a prostaglandina G₂ instável (PGG₂), uma reação de ciclooxygenase. Na segunda reação, PGG₂ é convertido no endoperóxido PGH₂, uma reação de peroxidase. O PGH₂ de vida curta, degrada não-enzimaticamente para PGE₂. Os compostos descritos no presente são o resultado de uma estratégia de pesquisa, que combinou um ensaio concentrado na inibição da atividade de peroxidase de COX-1 e COX-2, com um processo de desreplicação química para

identificar novos inibidores das enzimas COX.

[011] O termo expressão de genes freqüentemente é usado para descrever o resultado geral da produção de mRNA e da síntese de proteínas. De fato, mudanças na expressão de gene atual pode nunca resultar em mudanças observáveis no nível de proteína. O corolário, de que mudanças no nível de proteína, nem sempre resultam de mudanças na expressão de genes, também pode ser verdade. Existem seis pontos possíveis de regulação no caminho que leva de DNA genômico a uma proteína funcional: (1) regulação transcricional por fatores nucleares e outros sinais que levam à produção de pré-mRNA; (2) regulação de processamento de pré-mRNA, que envolve divisão éxon, as adições de uma estrutura de capeamento 5' e seqüência de polia-denilação 3' e transporte do mRNA maduro do núcleo para o citoplasma; (3) regulação do transporte de mRNA, controlando a localização do mRNA, para um local citoplasmático específico, para translação em proteína; (4) regulação da degradação do mRNA, controlando o tamanho da combinação de mRNA, quer antes de qualquer translação de proteína quer como um meio para terminar a translação daquele mRNA específico; (5) regulação de translação da razão específica da iniciação de translação de proteína e (6) regulação de processamento pós-translação, envolvendo modificações, tais como glicosilação e divisão proteolítica. No contexto da pesquisa genômica, é importante usar técnicas que medem níveis de expressão de genes mais próximos das etapas iniciais (p.ex., níveis de mRNA), em vez de etapas posteriores (p.ex., níveis de proteína) nesse caminho.

[012] Relatórios recentes referiram-se ao possível envolvimento de flavonóides, isolados da erva medicinal *Scutellaria baicalensis*, em alterações na expressão de genes de cox-2 (Wakabayashi and Yasui (2000) Eur. J. Pharmacol. 405:477-481; Chen et al. (2001) Biochem. Pharmacol. 61:1417-1427; Chi et al. (2001) 61:1195-1203 e Raso et al.

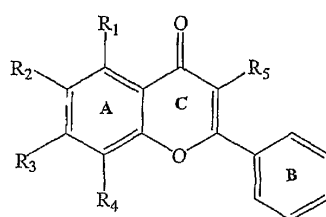
(2001) Life Sci. 68:921-931). Cada um dos estudos citados acima sobre expressão de genes de cox-2 usou uma técnica de Western Blot para avaliar alterações putativas na expressão de genes sem validação no nível molecular. Como esse método só mede níveis de proteína e não o produto de transcrição específico, mRNA, é possível que outros mecanismos estejam envolvidos levando ao aumento observado na expressão de proteína. Por exemplo, foi relatado que LPS modula a meia-vida de mRNA por meio de seqüências de instabilidade encontradas na região não-transladada 3' (3'UTR) de mRNAs (Watkins et al. (1999) Life Sci. 65:449-481), o que pode explicar o aumento da expressão de proteínas, sem alterações na razão da transcrição de genes. Conseqüentemente, isso deixa em aberto a questão de se essas condições de tratamento resultam em uma alteração significativa na expressão de genes.

[013] Técnicas, tais como análise de microdisposições de TaqPCR e DNA, baseiam-se em níveis de mRNA para análise e podem ser usadas para avaliar níveis de expressão de genes sob diferentes condições, isto é, na presença ou na ausência de um agente farmacêutico. Não existem informes conhecidos usando técnicas que medem especificamente a quantidade de mRNA, diretamente ou indiretamente, na literatura, quando flavonóides de anel-B-Livre ou flavanos são usados como os agentes terapêuticos.

[014] Flavonóides são um grupo amplamente distribuído de produtos naturais. A ingestão de flavonóides demonstrou estar inversamente associada ao risco de demência incidente. Especula-se que o mecanismo de ação, embora não conhecido, seja devido aos efeitos antioxidantes de flavonóides (Commenges et al. (2000) Eur. J. Epidemiol. 16:357-363). Flavonas de polifenol induzem a morte celular programada, diferenciação e inibição de crescimento em colonócitos transformados por atuação no nível de mRNA em genes incluindo cox-

2, Nuclear Factor kappa B (NFkB) e bcl-X(L) (Wenzel et al. (2000) Cancer Res. 60:3823-3831). Foi relatado que o número de grupos hidroxila no anel B é importante na supressão da atividade transcricional de cox-2 (Mutoh et al. (2000) Jpn. J. Cancer Res. 91:686-691).

[015] Flavonas de anel-B-Livre e flavonóis são uma classe específica de flavonóides, que não têm grupos substituintes no anel B aromático (referido, doravante, como flavonóides de anel-B-Livre), tal como ilustrado pela seguinte estrutura geral:



na qual

[016] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, OR, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, mas não-limitados a aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, cetohexose e os derivados químicos dos mesmos;

sendo que

[017] R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

[018] X é escolhido do grupo de contra-ânions farmacologicamente aceitáveis, incluindo, mas não-limitados a hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato etc.

[019] Flavonóides de anel-B-Livre são relativamente raros. De 9,396 flavonóides sintetizados ou isolados de fontes naturais, apenas 231 flavonóides de anel-B-Livre são conhecidos (The Combined Chemical Dictionary, Chapman & Hall/CRC, Version 5:1, Junho 2001). Tem sido informado que flavonóides de anel-B-Livre têm atividade bio-

lógica diversa. Por exemplo, galangina (3,5,7-triidroxi-flavona) atua como um antioxidante e seqüestrador de radicais livres e acredita-se que seja um candidato promissor para anti-genotoxicidade e quimioprevenção de câncer. (Heo et al. (2001) *Mutat. Res.* 488:135-150). Ele é um inibidor de monofelonase de tirosinase (Kubo et al. (2000) *Bioorg. Med. Chem.* 8:1749-1755), um inibidor da carbonil redutase em corações de coelhos (Imamura et al. (2000) *J. Biochem.* 127:653-658), tem atividade antimicrobiana (Afolayan and Meyer (1997) *Ethnopharmacol.* 57:177-181) e atividade antiviral (Meyer et al. (1997) *J. Ethonopharmacol.* 56:165-169). Baicaleína e dois outros flavonóides de anel-B-livre têm atividade antiproliferativa contra células de câncer de mama em seres humanos (So et al. (1997) *Cancer Lett.* 112:127-133).

[020] Tipicamente, os flavonóides foram testados quanto à sua atividade, baseados, aleatoriamente, em sua disponibilidade. Ocasionalmente, a exigência da substituição no anel B foi enfatizada para atividade biológica específica, tal como a substituição de anel B exigida para ligação de alta afinidade à p-glicoproteína (Boumendjel et al. (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11:75-77): efeito cardiotônico (Itoigawa et al. (1999) *J. Etnopharmacol.* 65:267-272), efeito protetor sobre células endoteliais contra toxicidade induzida por hidróperóxido de ácido linoléico (kaneko and Baba (1999) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:323-328), atividade inibitória de COX-1 (Wang (2000) *Phytomedicine* 7:15-19) e atividade de endoperoxídeo sintase de prostaglandina (Kalkbrenner et al. (1992) *Pharmacology* 44:1-12). Apenas poucas publicações têm mencionado a importância do anel B não-substituído dos flavonóides de anel-B-Livre. Um exemplo é o uso de 2-fenil flavonas, que inibem oxidoreductase de aceitante de quinona, NADPH, como anticoagulantes potenciais (Chen et al. (2001) *Biochem. Pharmacol.* 61:1417-1427).

[021] O mecanismo de ação relatado com relação à atividade

antiinflamatória dos vários flavonóides de anel-B-Livre, era controverso. A atividade antiinflamatória dos flavonóides de anel-B-livre crisina (Liang et al. (2001) FEBS Lett. 496:12-18), wogonina (Chi et al. (2001) Biochem. Pharmacol. 61:1195-1203) e halangina (Raso et al. (2001) Life Sci. 68:921-931) foi associada à supressão de ciclooxigenase induzível e sintase de óxido nítrico por meio de ativação de receptor gama atividade por proliferador de peroxissoma (PPAR γ) e influência sobre desgranulação e liberação de AA (Tordera et al. (1994) Z. Naturforsch. [C] 49:235-240). Foi informado que oroxilina, baicaleína e wogonina inibem a atividade de 12-lipoxigenase sem afetar as ciclooxigenases (You et al. (1999) Arch. Pharm. Res. 22:18-24). Mais recentemente, informou-se que a atividade antiinflamatória de wogonina, baicalina e baicaleína ocorre através da inibição de sintase de óxido nítrico indutível e produção de enzima cox-2, induzida por inibidores de óxido nítrico e lipolissacarídeos (Chen et al. (2001) Biochem. Pharmacol. 61:1417-1427). Também foi informado que oroxilina age por meio da supressão da ativação de NFkB (Chen et al. (2001) Biochem. Pharmacol. 61:1417-1427). Finalmente, foi relatado que wogonina inibe a produção de PGE₂ indutível em macrófagos (Wakabayashi and Yasui (2000) Eur. J. Pharmacol. 406:477-481).

[022] A inibição da fosforilação de cinase de proteína ativada por mitógenos (MAPK) e liberação de PGE₂ induzida por inibição de ionóforo de Ca²⁺ A23187 por baicaleína foi informada como sendo o mecanismo da atividade antiinflamatória de *Scutellariae radix* (Nakahata et al. (1999) Nippon Yakurigaku Zasshi 114, Supp. 11:215P-219P; Nakahata et al. (1998) Amn. J. Chin. Med. 26:311-323). Diz-se que baicalina de *Scutellaria baicalensis* inibe a proliferação de células T estimulada por exotoxinas estafilocócicas super-antígenas e a produção de IL-1 β , IL-6, fator- α de necrose de tumor (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ) (Krakauer et al. (2001) FEBS Lett. 500:52-55). Desse modo, a

atividade antiinflamatória de baicalina foi associada à inibição dos caminhos de sinalização mediados por citocinas pró-inflamatórias, ativados por superantígenos. Porém, também foi proposto que a atividade antiinflamatória de baicalina é devido à ligação de uma variedade de quimiocinas, que limitam sua atividade biológica (Li et al. (2000) Immunopharmacol. 49:295-306). Recentemente, foram relatados os efeitos de baicalina sobre a expressão de moléculas de adesão, induzida por trombina e peptídeo agonista de receptor de trombina (Kimura et al. (2001) Planta Med. 67:331-334), bem como a inibição da cascata de MAPK (Nakahata et al. (1999) Nippon Yakurigaku Zasshi 114, Supp 11:215P-219P; Nakahata et al. (1998) Am. J. Chin. Med. 26:311-323).

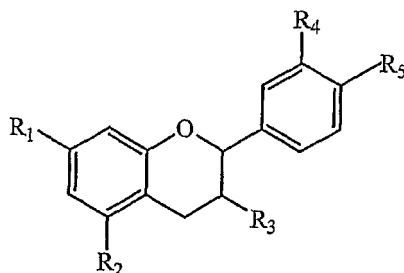
[023] A planta medicinal chinesa *Scutellaria baicalensis* contém quantidades significativas de flavonóides de anel-B-Livre, inclusive baicaleína, baicalina, wogonina e baicalenosida. Tradicionalmente, essa planta tem sido usada para tratar diversas doenças, inclusive dissipar calor, purgar fogo, umidade-quente e síndromes de febre de verão; polidipsia resultante de febre alta; carbúnculos, machucados e outras infecções piogênicas da pele; infecções respiratórias superiores, tais como tonsilite aguda, laringofaringite e escarlatina; hepatite viral; nefrite; pelvite; disenteria; hematemese e epistaxe. Essa planta também tem sido usada tradicionalmente para evitar aborto (veja Encyclopedia of Chinese Traditional Medicine, ShangHai Science and Technology Press, Shanghai, China, 1998). Clinicamente, *Scutellaria* é usada agora para tratar doenças tais como pneumonia pediátrica, diarreia bacteriana pediátrica, hepatite viral, inflamação aguda da vesícula biliar, hipertensão, inflamação aguda tópica resultante de cortes e cirurgia, asma brônquica e infecções respiratórias superiores (Encyclopedia of Chinese Traditional Medicine, ShangHai Science and Technology Press, Shanghai, China, 1998). Foi relatado que a eficácia farmacológica de raízes de *Scutellaria* para tratar asma brônquica está associa-

da à presença de flavonóides de anel-B-Livre e à supressão pelos mesmos do recrutamento de eosinófilos associado à eotaxina (Nakajima et al. (2001) *Planta Med.* 67(2):132-135).

[024] Até o presente, diversos flavonóides de anel B- livre, de ocorrência natural, têm sido comercializados para usos variáveis. Por exemplo, formulações de lipossoma de extratos de *Scutellaria* têm sido usadas para tratamento da pele (Pat. U.S. N°s 5,643,598; 5,443,983). Baicalina tem sido usada para evitar câncer, devido aos seus efeitos inibitórios sobre agentes oncogênicos (Pat. U.S. N° 6,290,995). Baicalina e outros compostos têm sido usados como agentes antivirais, antibacterianos e imunomoduladores (Pat. U.S. N° 6,083,921) e como antioxidantes naturais (Poland Pub. N° 9,849,256). Crisina tem sido usada por suas propriedades redutoras de ansiedade (Pat. U.S. N° 5,756,538). Flavonóides antiinflamatórios são usados para o controle e tratamento de doenças ano-retais e colônicas (Pat. U.S. N° 5,858,371) e inibição de lipoxigenase (Pat. U.S. N° 6,217,875). Esses compostos também são formulados com colágeno de glucosamina e outros ingredientes para reparar e conservar tecido conectivo (Pat. U.S. N° 6,333,304). Ésteres de flavonóide constituem os ingredientes ativos para composições cosméticas (Pat. U.S. N° 6,235,294). O Pedido U.S. N° de Série 10/091,362, depositado em 1 de março de 2002, intitulado "Identificação de Flavonóides de anel-B-Livre como Potentes Inibidores de COX-2", descreve um método para inibir a enzima de ciclooxigenase COX-2 por administração de uma composição que compreende um flavonóide de anel-B-Livre ou uma composição que contém uma mistura de flavonóides de anel-B-Livre a um hospedeiro que necessite da mesma. Esse é o primeiro relato de uma ligação entre flavonóides de anel-B-Livre e atividade inibitória de COX-2. Esse pedido está especificamente incorporado ao presente por referência, em sua totalidade.

[025] A Pat. Japonesa No. 63027435 descreve a extração e enriquecimento de baicaleína e a Pat. Japonesa No. 61050921 descreve a purificação de baicalina.

[026] Os flavanos incluem compostos representados pela seguinte estrutura geral:



na qual

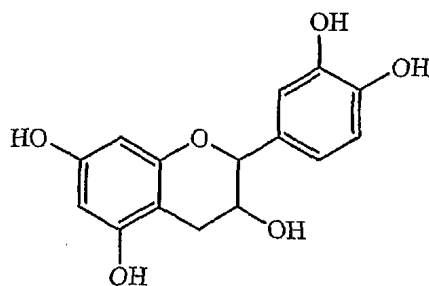
[027] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, -OCH₃, -SCH₃, -OR, -SR, -NH₂, -NRH, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, ésteres dos grupos de substituição mencionados, inclusive, mas não-limitados a, galato, acetato, cinamoíla e ésteres de hidroxila-cinamoíla, ésteres de triidroxibenzoíla e ésteres de cafeoíla, e os derivados químicos dos mesmos; um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, mas não-limitados a aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, cetohexose e os derivados químicos dos mesmos; dímeros, trímeros e outros flavanos polimerizados;

sendo que

[028] R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

[029] X é escolhido do grupo de contra-ânions farmaceuticamente aceitáveis, incluindo, mas não-limitados a hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto e carbonato, etc.

[030] A catequina é um flavano encontrado principalmente em *Acacia*, com a seguinte estrutura



catequina

[031] Catequina age tanto sozinha como em conjunto com outros flavonóides encontrados no chá e tem atividade tanto antiviral como antioxidante. Catequina mostrou ser eficaz no tratamento de hepatite viral. Também parece evitar danos oxidativos ao coração, rins, pulmões e baço e foi demonstrado que inibe o crescimento de células cancerosas do estômago.

[032] A catequina e seu isômero epicatequina inibem a sintase de endoperóxido de prostaglandina com um valor de IC_{50} de 40 μM . (Kalkbrenner et al. (1992) Pharmacol. 44:1-12). Cinco derivados de flavan-3-ol, inclusive (+)-catequina e galocatequina, isolados das quatro espécies de plantas, *Atuna racemosa*, *Syzygium carynocarpum*, *Syzygium malaccense* e *Vantanea peruviana*, apresentam uma atividade inibitória igual ou mais fraca contra COX-2, em relação a COX-1, com valores de IC_{50} variando de 3,3 μM a 138 μM (Noreen et al. (1998) Planta Med. 64:520-524). (+)-Catequina, isolada da casca de *Ceiba pentandra*, inibe COX-1 com um valor de IC_{50} de 80 μM (Noreen et al. (1998) J. Nat. Prod. 61:8-12). (+)-Catequina pura, disponível comercialmente, inibe COX-1 com um valor de IC_{50} em torno de 183 a 279 μM , dependendo das condições experimentais, sem seletividade para COX-2 (Noreen et al. (1998) J. Nat. Prod. 61:1-7).

[033] Catequina de chá verde, quando administrada como suplemento nas dietas de ratos machos Sprague dawley, baixou o nível de atividade da plaqueta PLA_2 e reduziu significativamente os níveis de ciclooxygenase das plaquetas (Yang et al. (1999) J. Nutr. Sci. Vita-

minol. 45:337-346). Sabe-se que catequina e epicatequina suprimem fracamente a transcrição do gene *cox-2* nas células de DLD-1 de câncer de cólon humano ($IC_{50} = 415,3 \mu M$) (Mutoh et al. (2000) Jpn. J. Cancer Res. 91:686-691). A capacidade neuroprotetora de (+)-catequina de vinho tinto resulta das propriedades antioxidantes de catequina, mais do que dos efeitos inibitórios em enzimas intracelulares, tal como ciclooxigenase, lipoxigenase ou sintase de óxido nítrico (Bastianetto et al. (2000) Br. J. Pharmacol. 131:711-720). Derivados de catequina purificados de chá verde e chá preto, tal como epigallocatequina-3-galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina-3-galato (ECG) e teaflavinas mostraram inibição de metabolismo de AA, dependente de ciclooxigenase e lipoxigenase, na mucosa do cólon humano e tecidos tumorais do cólon (Hong et al. (2001) Biochem. Pharmacol. 62:1175-1183) e induziram a expressão do gene *cox-2* e a produção de PGE_2 (Park et al. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 286:721-725); Epiafzelequina, isolada das partes aéreas de *Celastrus orbiculatus* apresentaram inibição dependente de dose da atividade de COX-1, com um valor de IC_{50} de $15 \mu M$ e também demonstraram atividade antiinflamatória contra edema de pata de camundongo induzida por carregenina, após a administração oral, a uma dosagem de 100 mg/kg (Min et al. (1999) Planta Med. 65:460-462).

[034] Catequina e seus derivados de várias fontes vegetais, especialmente de folhas de chá verde, têm sido usados no tratamento de Condyloma acuminata infectado por HPV (Cheng, Pat. U.S. Nº 5,795,911) e no tratamento de hiperplasia causada por vírus de papiloma (Cheng, Pat. U.S. Nos 5,968,973 e 6,197,808). Catequina e seus derivados também têm sido usados topicamente, para inibir angiogênese em tecido de mamíferos, em doenças tais como câncer de pele, psoríase, teias de veias, círculos abaixo dos olhos (Anderson, Pat. U.S. Nº 6,248,341), contra tumorigênese induzida por UVB em camun-

dongos (Agarwal et al. (1993) Photochem. Photobiol. 58:695-700), para inibir a sintase de óxido nítrico no nível da expressão de genes e da atividade enzimática (Chan, Pat. U.S. Nº 5,922,756), e como agentes para crescimento de cabelo (Takahashi, Pat. U.S. Nº 6,126,940). Composições baseadas em catequina também foram formuladas com outros extratos e vitaminas para tratamento de acne (Murad, Pat. U.S. Nº 5,962,517), endurecimento do tecido de órgãos digestivos (Shi, Pat. U.S. Nº 5,470,589, e para inibir atividade de redutase 5 alfa no tratamento de doenças associadas a distúrbios androgênicos e de cânceres (Liao, Pat. U.S. Nº 5,605,929). Extrato de chá verde foi formulado com sete outros extratos de plantas para reduzir inflamação pela inibição da enzima COX-2, sem identificação de qualquer componente ativo específico (Mewmark, Pat. U.S. Nº 6,264,995).

[035] *Acacia* é um gênero de árvores e arbustos leguminosos. O gênero *Acacia* inclui mais de 1.000 espécies, que pertencem à família das Leguminosae e à subfamília das Mimosoideae. As *Acacias* estão distribuídas em todo o mundo, em locais tais como áreas tropicais e subtropicais da América Central e do Sul, África, partes da Ásia bem como Austrália, que tem o maior número de espécies endêmicas. As *Acacias* estão presentes, principalmente, em regiões secas e áridas, onde as florestas são, freqüentemente, da natureza de arbustos espinhosos, abertos. O gênero *Acacia* está dividido em 3 subgêneros, com base, principalmente, na morfologia da folha - *Acacia*, *Aculiferum* e *Heterophyllum*. Porém, com base na natureza das folhas de árvores adultas, o gênero *Acacia* pode ser dividido em dois grupos "populares" - as espécies típicas, de folhas bipinuladas e as espécies filódenas. Um filódio é um pecíolo modificado, expandido para uma estrutura semelhante a folha, sem folhinhas, uma adaptação a condições xerofíticas. As espécies típicas, de folhas bipinuladas, são encontradas principalmente nos trópicos, enquanto as espécies filódenas ocorrem princi-

palmente na Austrália. Mais de 40 espécies de *Acacia* foram identificadas na Índia. Gamble, em seu livro intitulado *Flora of Madras Presidency* relacionou 23 espécies nativas do sul da Índia, 15 das quais são encontradas em Tamil Nadu. Desde então, porém, muitas espécies novas de *Acacia* foram introduzidas na Índia e aproximadamente 40 espécies são encontradas agora na própria Tamil Nadu. As espécies nativas são, principalmente, árvores ou arbustos espinhosos e algumas espinhosas, que aparecem esporadicamente em alguns locais, tal como *A. caesia*, *A. Pannata* e *A. sinuata*. Muitas espécies foram introduzidas da África e da Austrália, inclusive *A. mearnsii*, *A. picnantha* e *A. dealbata*, que têm folhas pinuladas, e *A. auriculiformis*, *A. holosericea* e *A. mangium*, que são espécies filódenas.

[036] As *Acacias* são muito importantes economicamente, fornecendo uma fonte de taninos, gomas, madeira, combustível e forragem. Os taninos, que são isolados principalmente da casca, são usados amplamente para curtir couros e peles. Algumas cascas de *Acacia* também são usadas para aromatizar bebidas alcoólicas locais. Algumas espécies nativas, tal como *A. sinuata*, também fornecem saponinas, que são quaisquer glicosídeos que formam espumas saponáceas quando misturados e agitados com água. As saponinas são usadas em detergentes, agentes espumantes e emulsificantes. As flores de algumas espécies de *Acacia* são aromáticas e são usadas para fazer perfumes. Por exemplo, perfume de acácia é obtido de *A. ferrugenea*. O miolo da madeira de muitas *Acacias* é usado para fazer implementos agrícolas e também fornece uma fonte de madeira para queimar. As gomas de *Acacia* encontram amplo uso na medicina e na área de confeitaria, e como materiais para gomar e de acabamento na indústria têxtil. Insetos de laca podem ser criados em diversas espécies, inclusive *A. nilotica* e *A. catechu*. Algumas espécies têm sido usadas para reflorestamento de áreas degradadas, inclusive *A. nilotica*, que

pode resistir a alguma inundação de água, e algumas dessas áreas tornaram-se santuários de pássaros.

[037] Até o presente, aproximadamente 330 compostos foram isolados de diversas espécies de *Acacia*. Flavonóides, um tipo de pigmento vegetal solúvel em água, são a classe principal de compostos isolados de *Acacias*. Aproximadamente 180 flavonóides diferentes foram identificados, 111 dos quais são flavanos. Terpenóides são a segunda maior classe de compostos isolados de espécies do gênero *Acacia*, com 48 compostos identificados. Outras classes de compostos isolados de *Acacia* incluem alcalóides (28), aminoácidos/peptídeos (20), taninos (16), carboidratos (15), heterociclos de oxigênio (15) e compostos alifáticos (10). (Buckingham, em *The Combined Chemical Dictionary*, Chapman & Hall CRC, versão 5:2, Dez. 2001).

[038] Compostos fenólicos, particularmente flavanos, são encontrados em concentrações moderadas a altas em todas as espécies de *Acacia* (Abdulrazak et al. (2000) J. Anim. Sci. 13:935-940). Historicamente, a maioria das plantas e extratos do gênero *Acacia* têm sido utilizada como adstringentes para tratar distúrbios gastrointestinais, diarreia, indigestão e para parar sangramentos (Vautrin (1996) Université Bourgogne (França) European abstract 58-01C:177; Saleem et al. (1998) Hamdard Midicus 41:63-67). A casca e vagens de *A. arabica Willd* contêm grandes quantidades de taninos e foram utilizados como adstringentes e expectorantes (Nadkarni (1996) India Materia Medica, Bombay Popular Prakshan, pp. 9-17). Foi informado que derivados de diarilpropanol, isolados da casca do tronco de *A. tortilis*, da Somália, têm efeitos relaxantes da musculatura lisa (Hagos et al. (1987) Planta Med. 53:27-31, 1987). Também foi relatado que saponinas de terpenóide isoladas de *A. victoriae* têm um efeito inibidor sobre carcinogênese de pele murina induzida por dimetilbenz(a)antraceno (Hanausek et al. (2000) Proc. Am. Assoc. Can. Res. Annu. Mtg. 41:663) e induzem

apoptose (Haridas et al. (2000) Proc. Am. Assoc. for Can. Res. Annu. Mtg. 41:600). Extratos vegetais de *A. nilotica* foram identificados como tendo atividade espasmogênica, vasoconstritora e anti-hipertensiva (Amos et al. (1999) Phytotherapy Research 13:683-685; Gilani et al. (1999) Phytotherapy Research 13:665-669) e atividade agregativa antiplaquetas (Shah et al. (1997) Gen. Pharmacol. 29:251-255). Atividade antiinflamatória foi informada para *A. nilotica*. Especulou-se que flavonóides, polissacarídeos e ácidos orgânicos seriam componentes ativos potenciais (Dafallah and Al-Mustafa (1996) Am. J. Chin. Med. 24:263-269). Até o presente, o único inibidor de 5-lipoxigenase identificado, isolado de *Acacia*, é uma carboxamida monoterpênica (Seikine et al. (1997) Chem. Pharm. Bull. (Tóquio) 45:148-11).

[039] Gomas de *Acacia* foram formuladas com outros ingredientes vegetais e usadas para prevenção de úlceras, sem identificação de qualquer um dos ingredientes ativos (Fuisz, Pat. U.S. Nº 5,651,987). Gomas de *Acacia* também foram formuladas com outros ingredientes vegetais e usados para aperfeiçoar a dissolução de drogas (Blank, Pat. U.S. Nº 4,946,684), baixando a viscosidade de composições nutricionais (Chancellor, Pat. U.S. Nº 5,545,411).

[040] O extrato da casca de *Acacia* foi patenteado no Japão para uso externo, como agente branqueador (Abe, JP10025238), como inibidor de transferase de glicosila para aplicações dentárias (Abe, JP07242555), como inibidor de síntese de proteínas (Fukai, JP 07165598), como agente seqüestrante de oxigênio ativo para preparações externas para a pele (Honda, JP 07017847), Bindra Pat. U.S. Nº 6,126,950) e como inibidor de hialuronidase para consumo oral, para evitar inflamação, polinose e tosse (Ogura, JP 07010768).

[041] O exame da literatura não revelou quaisquer aplicações clínicas usando misturas de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos para alívio de dor ou medição de resultados clínicos bioquímicos para

tratamento de osteoartrite. Este estudo para ser o primeiro estudo randomizado, duplo cego, controlado por placebo, da segurança e eficácia desses compostos em seres humanos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[042] A presente invenção inclui uma composição nova de material constituído de uma mistura de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos. Essa nova composição de material é designada doravante por Univestin®. A relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos na composição de material pode ser ajustada com base nas indicações e necessidades específicas com relação à prevenção e ao tratamento de uma doença ou condição específica. Em geral, a relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos pode estar na faixa de 99:1 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos para 1:99 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos. Em modalidades específicas da presente invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos é escolhida do grupo que consiste em aproximadamente 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 e 10:90. Em uma modalidade preferida da invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos na composição de material é de, aproximadamente, 85:15. Em uma modalidade preferida, os flavonóides de anel-B-Livre são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas *Scutellaria* e os flavanos são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas de *Acacia*.

[043] A presente invenção inclui, ainda, métodos que são eficazes em inibir, simultaneamente, tanto as enzimas COX-2 como as enzimas 5-LO. O método para a inibição dual, simultânea, dos caminhos de COX-2 e 5-LO consiste em administrar uma composição que compreende uma mistura de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos, sintetizados e/ou isolados de uma única planta ou plantas múltiplas, a um hospedeiro que necessite da mesma. A eficácia desse método foi demonstrada com enzimas purificadas, em diferentes linhas de células,

múltiplos modelos animais e, eventualmente, em um estudo clínico humano. A relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos na composição pode estar na faixa de 99:1 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos a 1:99 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos. Em modalidades específicas da presente invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos é escolhida do grupo que consiste em, aproximadamente 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 e 10:90. Em uma modalidade preferida da invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos na composição de material é de, aproximadamente 85:15. Em uma modalidade preferida, os flavonóides de anel-B-Livre são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas *Scutellaria* e os flavanos são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas de *Acacia*.

[044] A presente invenção inclui ainda métodos para a prevenção e tratamento de doenças e condições mediadas por COX-2 e 5-LO, inclusive, mas não-limitados a cólicas menstruais, arteriosclerose, ataque cardíaco, obesidade, diabetes, síndrome X, mal de Alzheimer, reação alérgica respiratória, insuficiência venosa crônica, hemorróidas, Eritromatose de Lupus Sistêmico, psoríase, dor de cabeça de tensão crônica, dores de cabeça de enxaqueca, doença intestinal inflamatória, infecções tópicas causadas por vírus, bactérias e fungos, queimadura solar, queimaduras térmicas, dermatite de contato, melanoma e carcinoma. O método para evitar e tratar doenças e condições mediadas por COX-2 e 5-LO consiste em administrar a um hospedeiro que necessite da mesma uma quantidade eficaz de uma composição que compreende uma mistura de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos sintetizados e/ou isolados de uma única planta ou de plantas múltiplas, junto com um veículo farmacologicamente aceitável. A relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos pode estar na faixa de 99:1 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos para 1:99 de flavonóides de anel-

B-Livre:flavanos. Em modalidades específicas da presente invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos é escolhida do grupo que consiste em aproximadamente 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 e 10:90. Em uma modalidade preferida da invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos na composição de material é de, aproximadamente, 85:15. Em uma modalidade preferida, os flavonóides de anel-B-Livre são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas *Scutellaria* e os flavanos são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas de *Acacia*.

[045] Em uma outra modalidade, a presente invenção inclui um método para tratar dor e rigidez de juntas em geral, melhorando a mobilidade e a função física e evitando e tratando condições patológicas de osteoartrite e artrite reumatóide. O método para evitar e tratar dor e rigidez das juntas, melhorando a mobilidade e a função física e evitando e tratando condições patológicas de osteoartrite e artrite reumatóide, consiste em administrar a um hospedeiro que necessite da mesma, uma quantidade eficaz de uma composição que compreende uma mistura de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos sintetizados e/ou isolados de uma única planta ou de plantas múltiplas, junto com um veículo farmacêuticamente aceitável. A relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos pode estar na faixa de 99:1 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos para 1:99 de flavonóides de anel-B-Livre: flavanos. Em modalidades específicas da presente invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos é escolhida do grupo que consiste em aproximadamente 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 e 10:90. Em uma modalidade preferida da invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos na composição de material é de, aproximadamente, 85:15. Em uma modalidade preferida, os flavonóides de anel-B-Livre são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas *Scutellaria* e os flavanos são isolados de uma planta

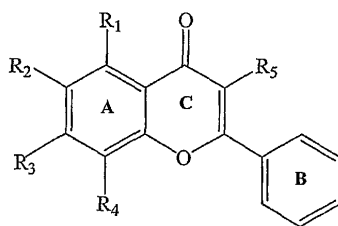
ou plantas do gênero de plantas de *Acacia*.

[046] A presente invenção inclui métodos para perda de peso e controle de açúcar no sangue, devido a uma atividade física aumentada, resultante do aperfeiçoamento da mobilidade, flexibilidade e função física, sendo que o referido método compreende administrar a um hospedeiro que necessite da mesma uma quantidade eficaz de uma composição que compreende uma mistura de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos sintetizados e/ou isolados de uma única planta ou de plantas múltiplas, junto com um veículo farmacologicamente aceitável. A relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos pode estar na faixa de 99:1 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos para 1:99 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos. Em modalidades específicas da presente invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos é escolhida do grupo que consiste em aproximadamente 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 e 10:90. Em uma modalidade preferida da invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos na composição de material é de, aproximadamente, 85:15. Em uma modalidade preferida, os flavonóides de anel-B-Livre são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas *Scutellaria* e os flavanos são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas de *Acacia*.

[047] A presente invenção também inclui um método para modular a produção de mRNA implicado em caminhos de dor, sendo que o referido método compreende administrar a um hospedeiro que necessite da mesma uma quantidade eficaz de uma composição que compreende uma mistura de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos sintetizados e/ou isolados de uma única planta ou de plantas múltiplas, junto com um veículo farmacologicamente aceitável. Embora não-limitado por teoria, o Requerente acredita que a capacidade de modular a produção de mRNA é alcançada por meio de uma diminuição,

pelos ingredientes ativos na composição de anel B-Livre/flavano, na produção de mRNA pelo gene de cox-2, mas não pelo gene de cox-1. A relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos pode estar na faixa de 99:1 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos para 1:99. Em modalidades específicas da presente invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos é escolhida do grupo que consiste em aproximadamente 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 e 10:90. Em uma modalidade preferida da invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos na composição de material é de, aproximadamente, 85:15. Em uma modalidade preferida, os flavonóides de anel-B-Livre são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas *Scutellaria* e os flavanos são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas de *Acacia*.

[048] Os flavonóides de anel-B-Livre, também referidos no presente como flavonas de anel-B-Livre e flavonóis, que podem ser usados de acordo com a invenção seguinte incluem compostos ilustrados pela estrutura geral seguinte:



na qual

[049] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, OR, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, mas não-limitados a aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, cetohexose e os derivados químicos dos mesmos;

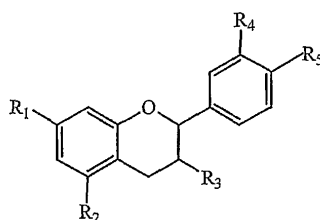
sendo que

[050] R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono;

e

[051] X é escolhido do grupo de contra-ânions farmaceuticamente aceitáveis, incluindo, mas não-limitados a hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato etc.

[052] Os flavanos que podem ser usados de acordo com a seguinte invenção, incluem compostos ilustrados pela seguinte estrutura geral:



na qual

[053] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, OCH_3 , $-SCH_3$, -OR, -SR, $-NH_2$, -NRH, $-NR_2$, $-NR_3^+X^-$, ésteres dos grupos de substituição mencionados, inclusive, mas não-limitados a, galato, acetato, cinamoíla e ésteres de hidroxil-cinamoíla, ésteres de triidroxibenzoíla e ésteres de cafeoíla, e os derivados químicos dos mesmos; um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, mas não-limitados a aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, ceto-hexose e os derivados químicos dos mesmos; dímeros, trímeros e outros flavanos polimerizados; sendo que

[054] R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

[055] X é escolhido do grupo de contra-ânions farmaceuticamente aceitáveis, incluindo, mas não-limitados a hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato etc.

[056] Os flavonóides de anel-B-Livre desta invenção podem ser obtidos por métodos sintéticos ou extraídos das famílias de plantas

que incluem, mas não estão limitados a *Annonaceae*, *Asteraceae*, *Bignoniaceae*, *Combretaceae*, *Compositae*, *Euphorbiaceae*, *Labiatae*, *Lauranceae*, *Luguminosae*, *Moraceae*, *Pinaceae*, *Pteridaceae*, *Sinopteridaceae*, *Ulmaceae* e *Zingiberaceae*. Os flavonóides de anel-B-Livre podem ser extraídos, concentrados e purificados dos gêneros de plantas altas, que incluem, mas não estão limitadas a *Desmos*, *Achyrocline*, *Oroxylum*, *Buchenavia*, *Anaphalis*, *Cotula*, *Gnaphalium*, *Helichrysum*, *Centaurea*, *Eupatorium*, *Baccharis*, *Sapium*, *Scutellaria*, *Molssa*, *Colebrookea*, *Stachys*, *Origanum*, *Ziziphroa*, *Lindera*, *Actinodaphne*, *Acacia*, *Derris*, *Glycyrrhiza*, *Millettia*, *Pongamia*, *Tephrosia*, *Artocarpus*, *Ficus*, *Pityrogramma*, *Notholaena*, *Pinus*, *Ulmus* e *Alpinia*.

[057] Tal como pode ser observado acima, os flavanos desta invenção podem ser obtidos de uma planta ou plantas escolhidas do gênero da *Acacia*. Em uma modalidade preferida, a planta é escolhida do grupo que consiste em *Acacia catechu*, *A. concinna*, *A. farnesiana*, *A. Senegal*, *A. speciosa*, *A. arabica*, *A. caesia*, *A. pennata*, *A. sinuata*, *A. mearnsii*, *A. picnantha*, *A. dealbata*, *A. aruriculiformis*, *A. holosericea* e *A. mangium*.

[058] A presente invenção inclui uma avaliação de diferentes composições de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos usando modelos enzimáticos e *in vivo*, para otimizar a formulação e obter a melhor potência. A eficácia e segurança dessa formulação também é demonstrada em estudos clínicos humanos. A presente invenção põe à disposição um processo comercialmente viável para o isolamento, purificação e combinação de flavanos de *Acacia* com flavonóides de anel-B-Livre para produzir uma composição de material com uma atividade fisiológica desejável. As composições desta invenção podem ser administradas por qualquer método conhecido de quem é versado na técnica. Os modos de administração incluem, mas não estão limitados a, administração enteral (oral), administração parenteral (intravenosa,

subcutânea e intramuscular) e aplicação tópica. O método de tratamento de acordo com esta invenção compreende administrar internamente ou topicamente a um paciente em necessidade dos mesmos, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma mistura de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos sintetizados e/ou isolados de uma planta única ou de plantas múltiplas.

[059] Deve ficar entendido que tanto a descrição geral acima como a descrição detalhada abaixo são apenas exemplificadas explanatórias e não são restritivas da invenção, tal como reivindicada.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[060] A Figura 1 representa graficamente a inibição de COX-1 e COX-2 por frações de HTP de *Acacia catechu*. Os extratos foram preparados e fracionados tal como descrito nos Exemplos 1 e 3. Os extratos foram examinados quanto à sua inibição da atividade de peroxidase de COX-1 ovino recombinante (v) ou COX-2 ovino (v), tal como descrito no Exemplo 2. Os dados são apresentados como percentual de controle não-tratado.

[061] A Figura 2 representa graficamente a inibição de COX-1 e COX-2 por frações de HTP de *Scutellaria baicalensis*. Os extratos foram preparados e fracionados tal como descrito nos Exemplos 1 e 3. Os extratos foram examinados quanto à sua inibição da atividade de peroxidase de COX-1 ovino recombinante (v) ou COX-2 ovino (v), tal como descrito no Exemplo 2. Os dados são apresentados como percentual de controle não-tratado.

[062] A Figura 3 representa um cromatograma de HPLC de um extrato padronizado isolado das raízes de *Scutellaria baicalensis* (lote Nº RM052302-01) com um conteúdo de flavonóide de anel-B-Livre de 82,2%. Dez estruturas foram explicadas usando HPLC/PDA/EM, como baicalina, wogonina-7-glucuronida, oroxilina A 7-glicoronida, baicaleína, wogonina, crisina-7-glucuronida, norwogonina-7-glucuronida, scu-

tellarina, crisina e oroxilina A.

[063] A Figura 4 representa graficamente um perfil da inibição de COX-1 e COX-2 pela baicaleína, que foi isolada e purificada de *Scutellaria baicalensis*. O composto foi examinado quanto à sua inibição da atividade de peroxidase de COX-1 ovino (v) e COX-2 ovino (v) recombinante. Os dados são apresentados como inibição percentual de testes sem inibidor vs. concentração de inibidor ($\mu\text{g/mL}$). O IC_{50} para COX-1 foi calculado como 0,18 $\mu\text{g/mL/unidade}$ de enzima, enquanto o IC_{50} para COX-2 foi calculado como 0,28 $\mu\text{g/mL/unidade}$.

[064] A Figura 5 representa graficamente um perfil da inibição de COX-1 e COX-2 pela baicaleína, que foi isolada e purificada de *Scutellaria baicalensis*. O composto foi examinado quanto à sua inibição da atividade de peroxidase de COX-1 ovino (v) e COX-2 ovino (v) recombinante. Os dados são apresentados como inibição percentual de testes sem inibidor vs. concentração de inibidor ($\mu\text{g/mL}$). O IC_{50} para COX-1 foi determinado como sendo 0,44 $\mu\text{g/mL/unidade}$ de enzima, enquanto o IC_{50} para COX-2 foi determinado como sendo 0,28 $\mu\text{g/mL/unidade}$.

[065] A Figura 6 representa graficamente um perfil da inibição de COX-1 e COX-2 por um extrato de flavonóide de anel-B-Livre padronizado (83% de baicalina, com base em HPLC), isolado de *Scutellaria baicalensis*. O extrato foi examinado quanto à sua inibição da atividade de peroxidase de COX-1 ovino (v) e COX-2 ovino (v) recombinante. Os dados são apresentados como inibição percentual de testes sem inibidor vs. concentração de inibidor ($\mu\text{g/mL}$). O IC_{50} para COX-1 foi calculado como 0,24 $\mu\text{g/mL/unidade}$ de enzima, enquanto o IC_{50} para COX-2 foi calculado como 0,48 $\mu\text{g/mL/unidade}$.

[066] A Figura 7 representa graficamente um perfil da inibição de COX-1 e COX-2 por catequina, que foi isolada e purificada de *Aca-*

cia catechu. O composto foi examinado quanto à sua inibição da atividade de peroxidase de COX-1 ovino (v) e COX-2 ovino (v) recombinante. Os dados são apresentados como inibição percentual de testes sem inibidor vs. concentração de inibidor ($\mu\text{g/mL}$). O IC_{50} para COX-1 foi determinado como sendo 0,11 $\mu\text{g/mL/unidade}$ de enzima, enquanto o IC_{50} para COX-2 foi determinado como sendo 0,42 $\mu\text{g/mL/unidade}$.

[067] A Figura 8 representa graficamente um perfil da inibição de COX-1 e COX-2 por um extrato de flavano padronizado, contendo 50% de catequinas totais, isoladas de *Acacia catechu*. O extrato foi examinado quanto à sua inibição da atividade de peroxidase de COX-1 ovino (v) e COX-2 ovino (v) recombinante. Os dados são apresentados como inibição percentual de testes sem inibidor vs. concentração de inibidor ($\mu\text{g/mL}$). O IC_{50} para COX-1 foi calculado como 0,17 $\mu\text{g/mL/unidade}$ de enzima, enquanto o IC_{50} para COX-2 foi determinado como sendo 0,41 $\mu\text{g/mL/unidade}$.

[068] A Figura 9 representa o cromatograma de HPLC dos flavanos extraídos de *Acacia catechu* com 80% de MeOH em água.

[069] A Figura 10 representa graficamente um perfil da inibição de 5-LO pela catequina de flavano de *Acacia catechu* purificada. O composto foi examinado quanto à sua inibição da atividade de 5-lipoxigenase de batata recombinante (v). Os dados são apresentados como inibição percentual de testes sem inibidor vs. concentração de inibidor ($\mu\text{g/mL}$). O IC_{50} para 5-LO foi de 1,38 $\mu\text{g/mL/unidade}$ de enzima.

[070] A Figura 11 representa graficamente um perfil da inibição de COX-1 e COX-2 pela composição de Uninvestin®, produzida através da combinação dos extratos de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos, em uma relação de 85:15, tal como descrito no Exemplo 14. Uninvestin® foi examinado quanto à sua inibição da atividade de peroxidase de COX-1 ovino (v) e COX-2 ovino (v) recombinante. Os dados são apresentados como inibição percentual de testes sem inibidor vs. concentração de ini-

bidor ($\mu\text{g/mL}$). O IC_{50} para COX-1 foi de $0,76 \mu\text{g/mL/unidade}$ de enzima, enquanto o IC_{50} para COX-2 foi de $0,80 \mu\text{g/mL/unidade}$.

[071] A Figura 12 representa graficamente um perfil da inibição de COX-1 e COX-2 pela composição de Uninvestin®, produzida através da combinação de flavonóides de anel-B-Livre e extratos de flavanos, em uma relação de 50:50, tal como descrito no Exemplo 14. Uninvestin® foi examinado quanto à sua inibição da atividade de peroxidase de COX-1 ovino (ν) e COX-2 ovino (ν) recombinante. Os dados são apresentados como inibição percentual de testes sem inibidor vs. concentração de inibidor ($\mu\text{g/mL}$). O IC_{50} para COX-1 foi de $0,38 \mu\text{g/mL/unidade}$ de enzima, enquanto o IC_{50} para COX-2 foi de $0,84 \mu\text{g/mL/unidade}$.

[072] A Figura 13 representa graficamente um perfil da inibição de COX-1 e COX-2 pela composição de Uninvestin®, produzida através da combinação dos extratos de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos, em uma relação de 20:80, tal como descrito no Exemplo 14. Uninvestin® foi examinado quanto à sua inibição da atividade de peroxidase de COX-1 ovino (ν) e COX-2 ovino (ν) recombinante. Os dados são apresentados como inibição percentual de testes sem inibidor vs. concentração de inibidor ($\mu\text{g/mL}$). O IC_{50} para COX-1 foi de $0,18 \mu\text{g/mL/unidade}$ de enzima, enquanto o IC_{50} para COX-2 foi de $0,41 \mu\text{g/mL/unidade}$.

[073] A Figura 14 representa o efeito de crescentes concentrações de Uninvestin® sobre a quantidade de LTB_4 (ν) novo, sintetizado, induzido por LPS, tal como determinado por ELISA em células THP-1 ou HT-29 (ATCC). A atividade do extrato combinado é expressa como % de inibição de síntese de LTB_4 induzida.

[074] A Figura 15 compara os níveis de LTB_4 , tal como determinados por ELISA, que permanecem em células HT-29 após o tratamento com $3 \mu\text{g/mL}$ de Uninvestin® em células não-induzidas com o tratamento com $3 \mu\text{g/mL}$ de ibuprofeno, tal como descrito no Exemplo 16.

[075] A Figura 16 compara o efeito de diversas concentrações de Uninvestin® sobre expressão de genes de cox-1 e cox-2. Os níveis de expressão estão padronizados para níveis de expressão de 18S rRNA (controle interno) e depois normalizados para o estado sem tratamento, sem LPS. Essa Figura demonstra uma diminuição na expressão de genes de cox-2, mas não de cox-1, após a estimulação por LPS e exposição a Uninvestin®.

[076] A Figura 17 compara o efeito de 3 µg/mL de Univetin® sobre a expressão de genes de cox-1 e cox-2 com a concentração equivalente de outras NSAIDs. Os níveis de expressão estão padronizados para níveis de expressão de 18S rRNA (controle interno) e depois normalizados para o estado sem tratamento, sem LPS.

[077] A Figura 18 representa graficamente dados sobre inchaço de orelha como uma medida de inibição de inflamação. Uninvestin® produzido através da combinação de extratos padronizados de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos, em uma relação de 80:20, foi comparado com camundongos não-tratados e camundongos que receberam indometacina (50 mg/kg) por meio de administração oral. Os dados são apresentados como a diferença em medição em micron do lobo de orelha não-tratado vs. tratado para cada camundongo.

[078] A Figura 19 mostra o efeito de 100 mg/kg de Uninvestin® (relação de 80:20 de extratos padronizados de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos) nos tornozelos de camundongos injetados com AA (Uninvestin® + ácido araquidônico), comparado com camundongos não-tratados (sem tratamento + ácido araquidônico), camundongos sem injeções de AA (controle negativo) ou camundongos que foram injetados com o veículo líquido (controle de veículo).

[079] A Figura 20 representa graficamente o intervalo de confiança de 95% para a nota WOMAC do índice de dor na linha de base, 30, 60 e 90 dias de tratamento com Uninvestin®, a uma dosagem de

250 mg/dia.

[080] A Figura 21 representa graficamente o intervalo de confiança de 95% para a nota WOMAC do índice de dor na linha de base, 30, 60 e 90 dias de tratamento com Univestin®, a uma dosagem de 500 mg/dia.

[081] A Figura 22 representa graficamente o intervalo de confiança de 95% para a nota WOMAC do índice de dor na linha de base, 30, 60 e 90 dias de tratamento com celecoxib, a uma dosagem de 200 mg/dia.

[082] A Figura 23 representa graficamente o intervalo de confiança de 95% para a nota WOMAC do índice de dor na linha de base, 30, 60 e 90 dias de tratamento com o placebo.

[083] A Figura 24 representa graficamente o intervalo de confiança de 95% para a nota WOMAC do índice de rigidez na linha de base, 30, 60 e 90 dias de tratamento com Univestin®, a uma dosagem de 250 mg/dia.

[084] A Figura 25 representa graficamente o intervalo de confiança de 95% para a nota WOMAC do índice de rigidez na linha de base, 30, 60 e 90 dias de tratamento com Univestin®, a uma dosagem de 500 mg/dia.

[085] A Figura 26 representa graficamente o intervalo de confiança de 95% para a nota WOMAC do índice de rigidez na linha de base, 30, 60 e 90 dias de tratamento com celecoxib, a uma dosagem de 200 mg/dia.

[086] A Figura 27 representa graficamente o intervalo de confiança de 95% para a nota WOMAC do índice de rigidez na linha de base, 30, 60 e 90 dias de tratamento com o placebo.

[087] A Figura 28 representa graficamente o intervalo de confiança de 95% para a nota WOMAC do índice de deterioração funcional na linha de base, 30, 60 e 90 dias de tratamento com Univestin®, a

uma dosagem de 250 mg/dia.

[088] A Figura 29 representa graficamente o intervalo de confiança de 95% para a nota WOMAC do índice de deterioração funcional na linha de base, 30, 60 e 90 dias de tratamento com Uninvestin®, a uma dosagem de 500 mg/dia.

[089] A Figura 30 representa graficamente o intervalo de confiança de 95% para a nota WOMAC do índice de deterioração funcional na linha de base, 30, 60 e 90 dias de tratamento com celecoxib, a uma dosagem de 200 mg/dia.

[090] A Figura 31 representa graficamente o intervalo de confiança de 95% para a nota WOMAC do índice de dor na linha de base, 30, 60 e 90 dias de tratamento com placebo.

[091] A Figura 32 mostra o efeito de Uninvestin® a doses de 250 e 500 mg/dia sobre diminuição de BMI, em comparação com celecoxib a 200 mg/dia e o placebo.

[092] A Figura 33 mostra o efeito de Uninvestin® a doses de 250 e 500 mg/dia sobre diminuição de peso, em comparação com celecoxib a 200 mg/dia e o placebo.

[093] A Figura 34 mostra o efeito de Uninvestin® a doses de 200 e 500 mg/dia sobre a redução da glicose do sangue, em comparação com o placebo.

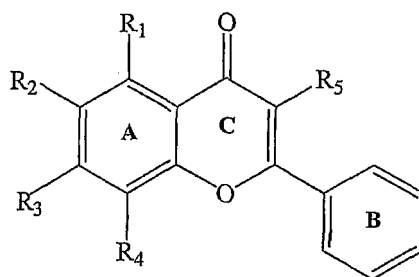
DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[094] Vários termos, tal como usados no presente, referem-se a aspectos da presente invenção. Para ajudar no esclarecimento da descrição dos componentes desta invenção, são apresentadas as seguintes definições.

[095] Deve ser observado que o termo "um" ou "uma" entidade se refere a um ou mais dessa entidade; por exemplo, um flavonóide se refere a um ou mais flavonóides. Desse modo, os termos "um" ou "uma", "um ou mais" e "pelo menos um" são usados de modo permutável no presen-

te.

[096] "Flavonóides de anel-B-Livre", tais como usados no presente, são uma classe específica de flavonóides, que não têm grupos substituintes no anel aromático B, tal como representado pela estrutura geral abaixo:



na qual

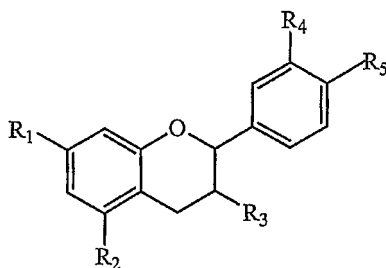
[097] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, OR, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, mas não-limitados a aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, cetohexose e os derivados químicos dos mesmos;

sendo que

[098] R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

[099] X é escolhido do grupo de contra-ânions farmacologicamente aceitáveis, incluindo, mas não-limitados à hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato etc.

[0100] "Flavanos" são uma classe específica de flavonóides, que podem ser representados, geral, pela seguinte estrutura geral:



na qual

[0101] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, OCH_3 , SCH_3 , -OR, -SR, - NH_2 , -NHR, - NR_2 , - $NR_3^+X^-$, ésteres dos grupos de substituição, inclusive, mas não-limitados a, galato, acetato, cinamoíla e ésteres de hidroxila-cinamoíla, ésteres de triidroxibenzoíla e ésteres de cafeoíla, e os derivados químicos dos mesmos; um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, mas não-limitados a aldopentoses, metil aldopentose, aldohexoses, ceto-hexose e os derivados químicos dos mesmos; dímeros, trímeros e outros flavanos polimerizados;

sendo que

[0102] R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

[0103] X é escolhido do grupo de contra-ânions farmaceuticamente aceitáveis, incluindo, mas não-limitados a hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato etc.

[0104] "Expressão de genes" se refere à transcrição de um gene para mRNA.

[0105] "Expressão de proteínas" se refere a uma translação de mRNA para uma proteína.

[0106] "TA-qPCR" é um método para transcrição inversa (TA) de uma molécula de mRNA para uma molécula de cDNA e depois avaliar quantitativamente o nível de expressão de genes usando uma reação em cadeia de polimerase (PCR), acoplada com um marcador fluorescente.

[0107] "Terapêutico", tal como usado no presente, inclui tratamento e/ou profilaxia. Quando usado, terapêutico se refere a humanos bem como a outros animais.

[0108] "Dose ou quantidade farmaceuticamente ou terapeuticamente eficaz" se refere a um nível de dosagem suficiente para induzir

um resultado biológico desejado. Esse resultado pode ser alívio dos sinais, sintomas ou casas de uma doença ou de qualquer outra alteração de um sistema biológico que seja desejada.

[0109] "Placebo" se refere à substituição da dose ou quantidade farmacologicamente ou terapeuticamente eficaz, suficiente para induzir um resultado biológico desejado, que pode aliviar os sinais, sintomas ou casas de doença, com uma substância não ativa.

[0110] "Hospedeiro" ou "paciente" é um ser vivo, humano ou animal, ao qual as composições descritas no presente são administradas.

[0111] Observe que ao longo deste pedido, são feitas diversas citações. Cada citação está especificamente incorporada em sua totalidade ao presente, por referência.

[0112] A presente invenção inclui uma nova composição de material, que consiste em uma mistura de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos. Essa nova composição de material é referida no presente como Univestin®. A relação de flavonóides para flavanos na composição de material pode ser ajustada com base nas indicações e nas necessidades específicas com relação à prevenção e ao tratamento de uma doença ou condição específico. Em geral, a relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos pode estar na faixa de 99:1 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos para 1:99 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos. Em modalidades específicas da presente invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos é escolhida do grupo que consiste em aproximadamente 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 e 10:90. Em uma modalidade preferida da invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos na composição de material é de, aproximadamente, 85:15. Em uma modalidade preferida, os flavonóides de anel-B-Livre são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas *Scutellaria* e os flavanos são

isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas de *Acacia*.

[0113] Em uma modalidade da presente invenção, o extrato de flavonóide de anel-B-Livre padronizado consiste nos compostos ativos com uma pureza de entre 1-99% (em peso) de flavonóides de anel-B-Livre totais, tal como definido nos exemplos 5, 7 e 13: Tabelas 5, 7, 8 e 9 e Figura 3. Baicalina é o principal componente ativo no extrato, que representa aproximadamente 50-90% (em peso) do total de flavonóides de anel-B-Livre. Em uma modalidade preferida, o extrato padronizado contém >70% de flavonóides de anel-B-Livre totais, dos quais >75% dos flavonóides de anel-B-Livre são baicalina.

[0114] Em uma modalidade, o extrato de flavano padronizado consiste nos compostos ativos com uma pureza de entre 1-99% (em peso) de flavanos totais, tal como definido nos exemplos 8, 9 e 12; Tabelas 4, 6 e 9 e Figura 9. Catequina é o principal componente ativo no extrato, e representa aproximadamente 50-90% (em peso) do total de flavanos. Em uma modalidade preferida, o extrato de flavano padronizado contém >50% de flavanos totais, dos quais >70% dos flavanos são catequina.

[0115] Em uma modalidade, Univestin® é produzido misturando os dois extratos acima ou compostos sintéticos em uma relação de 99:1 a 1:99. A relação preferida de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos é 85:15 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos, tal como definido no Exemplo 14.

[0116] A concentração de flavonóides de anel-B-Livre em Univestin® pode ser de aproximadamente 1% a 99% e a concentração de flavanos em Univestin® pode ser de 99% a 1%. Em uma modalidade preferida da invenção, a concentração de flavonóides de anel-B-Livre em Univestin® é de aproximadamente 75%, com um conteúdo de baicalina de aproximadamente 60% de peso total de Univestin®; e a concentração de flavanos totais em Univestin® é de aproximadamente

10%, com um conteúdo de catequina de aproximadamente 9%. Nessa modalidade, os componentes ativos totais (flavonóides de anel-B-Livre mais flavanos) em Uninvestin® são >80% do peso total.

[0117] A presente invenção também inclui métodos que são eficazes em inibir, simultaneamente, tanto as enzimas COX-2 como as enzimas 5-LO. O método para a inibição dual, simultânea, dos caminhos de COX-2 e 5-LO consiste em administrar uma composição que compreende uma mistura de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos, sintetizados e/ou isolados de uma única planta ou plantas múltiplas, a um hospedeiro que necessite da mesma. A relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos na composição pode estar na faixa de 99:1 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos a 1:99 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos. Em modalidades específicas da presente invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos é escolhida do grupo que consiste em, aproximadamente 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 e 10:90. Em uma modalidade preferida da invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos na composição de material é de, aproximadamente 85:15. Em uma modalidade preferida, os flavonóides de anel-B-Livre são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas *Scutellaria* e os flavanos são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas de *Acacia*.

[0118] A presente invenção inclui ainda métodos para a prevenção e tratamento de doenças e condições mediadas por COX-2 e 5-LO. O método para evitar e tratar doenças e condições mediadas por COX-2 e 5-LO consiste em administrar a um hospedeiro que necessite da mesma uma quantidade eficaz de uma composição que compreende uma mistura de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos sintetizados e/ou isolados de uma única planta ou de plantas múltiplas, junto com um veículo farmacologicamente aceitável. A relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos pode estar na faixa de 99:1 de flavonóides

de anel-B-Livre:flavanos para 1:99 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos. Em modalidades específicas da presente invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos é escolhida do grupo que consiste em aproximadamente 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 e 10:90. Em uma modalidade preferida da invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos na composição de material é de, aproximadamente, 85:15. Em uma modalidade preferida, os flavonóides de anel-B-Livre são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas *Scutellaria* e os flavanos são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas de *Acacia*.

[0119] Em ainda uma outra modalidade, a presente invenção inclui um método para tratar dor e rigidez de juntas em geral, melhorando a mobilidade e a função física e evitando e tratando condições patológicas de osteoartrite e artrite reumatóide. O método para evitar e tratar dor e rigidez das juntas, melhorando a mobilidade e a função física e evitando e tratando condições patológicas de osteoartrite e artrite reumatóide, consiste em administrar a um hospedeiro que necessite da mesma, uma quantidade eficaz de uma composição que compreende uma mistura de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos sintetizados e/ou isolados de uma única planta ou de plantas múltiplas, junto com um veículo farmaceuticamente aceitável. A relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos pode estar na faixa de 99:1 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos para 1:99 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos. Em modalidades específicas da presente invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos é escolhida do grupo que consiste em aproximadamente 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 e 10:90. Em uma modalidade preferida da invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos na composição de material é de, aproximadamente, 85:15. Em uma modalidade preferida, os flavonóides de anel-B-Livre são isolados de uma

planta ou plantas do gênero de plantas *Scutellaria* e os flavanos são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas de *Acacia*.

[0120] A presente invenção também inclui um método para modular a produção de mRNA implicado em caminhos de dor, sendo que o referido método compreende administrar a um hospedeiro que necessite da mesma uma quantidade eficaz de uma composição que compreende uma mistura de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos sintetizados e/ou isolados de uma única planta ou de plantas múltiplas, e, opcionalmente, um veículo farmaceuticamente aceitável. A relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos pode estar na faixa de 99:1 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos para 1:99 de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos. Em modalidades específicas da presente invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos é escolhida do grupo que consiste em aproximadamente 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 e 10:90. Em uma modalidade preferida da invenção, a relação de flavonóides de anel-B-Livre:flavanos na composição de material é de, aproximadamente, 85:15. Em uma modalidade preferida, os flavonóides de anel-B-Livre são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas *Scutellaria* e os flavanos são isolados de uma planta ou plantas do gênero de plantas de *Acacia*.

[0121] Os flavonóides de anel-B-Livre que podem ser usados de acordo com o método desta invenção incluem compostos representados pela estrutura geral apresentada acima. Os flavonóides de anel-B-Livre desta invenção podem ser obtidos por métodos sintéticos ou podem ser isolados da família de plantas que incluem, mas não estão limitadas a, *Annonaceae*, *Asteraceae*, *Bignoniaceae*, *Combretaceae*, *Compositae*, *Euphorbiaceae*, *Labiatae*, *Lauraceae*, *Leguminosae*, *Moraceae*, *Pinaceae*, *Pteridaceae*, *Sinopteridaceae*, *Ulmaceae* e *Zingiberaceae*. Os flavonóides de anel-B-Livre também podem ser extraídos, concentrados e purificados dos gêneros de plantas altas, que in-

cluem mas não estão limitadas a *Desmos*, *Achyrocline*, *Oroxylum*, *Buchenavia*, *Anaphalis*, *Cotula*, *Gnaphalium*, *Helichrysum*, *Centaurea*, *Eupatorium*, *Baccharis*, *Sapium*, *Scutellaria*, *Molsa*, *Colebrookea*, *Stachys*, *Origanum*, *Ziziphora*, *Lindera*, *Actinodaphne*, *Acacia*, *Derris*, *Glycyrrhiza*, *Millettia*, *Pongamia*, *Tephrosia*, *Artocarpus*, *Ficus*, *Pityrogramma*, *Notholaena*, *Pinus*, *Ulmus* e *Alpinia*.

[0122] Os flavonóides de anel-B-livre podem ser encontrados em diferentes partes de plantas, inclusive, mas não-limitados a troncos, cascas de troncos, galhos, tubérculos, raízes, cascas de raízes, brotos novos, sementes, rizomas, flores e outros órgãos reprodutores, folhas e outras partes aéreas. Métodos para a isolamento e purificação de flavonóides de anel-B-Livre estão descritos no Pedido U.S. Nº de Série 10/091.362, depositado em 1 de março de 2002, intitulado "Identificação de Flavonóides de Anel-B-Livre como Inibidores Potentes de COX-2", que está incorporado ao presente por referência, em sua totalidade.

[0123] Os flavanos que podem ser usados de acordo com o método desta invenção incluem compostos representados pela estrutura geral apresentada acima. Os flavanos desta invenção podem ser obtidos por métodos sintéticos ou podem ser isolados de uma planta ou plantas escolhidas do gênero de plantas da *Acacia*.

[0124] Em uma modalidade preferida, a planta é escolhida do grupo que consiste em *Acacia catechu*, *A. concinna*, *A. farnesiana*, *A. Senegal*, *A. speciosa*, *A. arabica*, *A. caesia*, *A. pennata*, *A. sinuata*, *A. mearnsii*, *A. pinantha*, *A. dealbata*, *A. auriculiformis*, *A. holosericea* e *A. mangium*.

[0125] Os flavanos podem ser encontrados em diferentes partes de plantas, inclusive, mas não-limitados a troncos, cascas de troncos, galhos, tubérculos, raízes, cascas de raízes, brotos novos, sementes, rizomas, flores e outros órgãos reprodutores, folhas e outras partes aéreas. Métodos para a isolamento e purificação de flavonóides de anel-

B-Livre estão descritos no Pedido U.S. Nº de Série 10/104.477, depositado em 22 de março de 2002, intitulado "Isolação de um Inibidor Dual de COX-2 e 5-Lipoxigenase de Acácia", que está incorporado ao presente por referência, em sua totalidade.

[0126] A presente invenção executa uma estratégia que combina uma série de estudos *in vivo*, bem como testes *in vitro* bioquímicos, celulares e de expressão de genes, para identificar extratos de planta ativos e componentes que inibem, especificamente, a atividade enzimática de COX-2 e 5-LO e afetam a produção de mRNA de *cox-2*, mas não de *cox-1*. Os métodos usados no presente, para identificar extratos de plantas e componentes ativos que inibem, especificamente, os caminhos de COX-2 e 5-LO, estão descritos nos Exemplos 1 a 13 (Figuras 1-10). Esses métodos estão descritos no Pedido U.S. Nº de Série 10/091.362, depositado em 1 de março de 2002, intitulado "Identificação de Flavonóides de Anel-B-Livre como Inibidores Potentes de COX-2" e Pedido U.S. Nº de Série 10/104.477, depositado em 22 de março de 2002, intitulado "Isolação de um Inibidor Dual de COX-2 e 5-Lipoxigenase de Acácia", cada um dos quais está especificamente incorporado ao presente por referência, em sua totalidade.

[0127] Esses estudos resultaram na constatação de uma nova composição de material referida no presente como Univestin®, que consistiu em uma mistura patenteada de dois extratos padronizados, que contêm flavonóides de anel-B-Livre e flavanos, respectivamente. Um exemplo geral para preparar essa composição é apresentado no Exemplo 14 usando dois extratos padronizados, isolados de *Acacia* e *Scutellaria*, respectivamente, junto com um ou mais excipientes. O extrato de *Acacia* usado no Exemplo 14 continha >60% de flavanos totais, tal como catequina e epicatequina, e o extrato de *Scutellaria* continha >70% de flavonóides de anel-B-Livre, que era principalmente baicalina. O extrato de *Scutellaria* continha outras quantidades meno-

res de flavonóides de anel-B-Livre, tal como mostrado na Tabela 11. Um ou mais excipientes são opcionalmente adicionados à composição de material. A quantidade de excipiente adicionado pode ser ajustada com base no conteúdo ativo efetivo de camada ingrediente desejado. Uma tabela de mistura para cada batelada individual de produto tem de ser gerada com base na especificação de produto e resultados de QC para ingredientes individuais da batelada. Quantidades adicionais de ingredientes ativos na limite de 2-5% são recomendadas para atender a especificação de produto. O Exemplo 14 representa uma tabela de mistura que foi gerada para uma batelada de Uninvestin (Lote#G1702-COX-2). Relações de mistura diferentes do produto Uninvestin® formulado foram testadas quanto à sua capacidade para inibir atividades enzimáticas de COX-2 e 5-LO, e para reduzir a produção de mRNA de *cox*, tal como descrito nos Exemplos 15-17.

[0128] O teste de inibição de COX-2 baseou-se na atividade da peroxidase de enzima na presença de heme e ácido araquidônico. A fim de selecionar compostos que inibem a atividade de COX-1 e COX-2, uma alta produção, foi desenvolvido um teste in vitro, que utilizou a inibição da atividade de peroxidase das duas enzimas, tal como mostrado nos Exemplos 2 a 6. Após isolar frações de plantas que inibem a atividade de COX-2 no processo de seleção, os dois extratos padronizados individuais, um composto principalmente de flavonóides de anel-B-Livre (isolados de *Scutellaria*) e o outro, de flavanos (isolados de *Acacia*), foram comparados bem como componentes purificados de cada extrato e relações diferentes dos extratos combinados, por titulação contra uma quantidade fixa das enzimas de COX-1 e COX-2. Esse estudo revelou que os flavonóides de anel-B-Livre purificados, baicalina e baicaleína, isolados de *Scutellaria bicalensis* e o flavano purificado, catequeína, isolada de *Acacia catechu*, inibiram a atividade de COX-2 e 5-LO. Adicionalmente, cada um dos extratos padronizados

individuais, que continha concentrações dos flavonóides de anel-B-Livre na faixa de 10-90% (com base em HPLC) e flavanos na faixa de 10-90 % (com base em HPLC), também inibirem a atividade de COX-2 e 5-LO. Finalmente, o estudo revelou que as composições que contêm misturas de cada um dos extratos padronizados individuais, com relações de flavonóides de anel-B-Livre para flavanos de, aproximadamente, 80:20, 50:50 e 20:80, também foram todas altamente eficaz para inibir a atividade enzimática de COX-2 *in vitro*. Os resultados são apresentados nas Figuras 11-13.

[0129] O Exemplo 16 descreve testes com células realizados que visavam a inibição de compostos na decomposição de ácido araquidônico no caminho de 5-LO, a saber, LTB₄. Os resultados são apresentados nas Figura 14 e 15.

[0130] O Exemplo 17 descreve uma experiência realizada para determinar a inibição diferencial do gene de cox-2 por Uninvestin®. Foram obtidos dados de expressão de genes para a inibição de produção de mRNA de cox-1 e cox-2 em um teste de TA-qPCR semiquantitativo. Os resultados são apresentados nas Figuras 16 e 17. Com referência à Figura 16, pode ser visto que Uninvestin® inibiu a produção de mRNA de cox-2 sem efetuar a expressão de genes de cox-1. Além disso, quando comparado com outras drogas inibidoras de COX-2, Uninvestin® foi capaz de diminuir aumentos estimulados por LPS na expressão de genes de cox-1 e cox-2. É importante notar que celecoxib e ibuprofeno aumentaram, ambos, a expressão de genes de cox-2 (Figura 17).

[0131] A eficácia *in vivo* foi demonstrada pela aplicação de substâncias irritantes da pele, tal como AA, às orelhas de camundongos e medição da redução do inchaço em camundongos tratados com Uninvestin®, tal como descrito no

[0132] Exemplo 18. Os resultados são apresentados na Figura

18. Adicionalmente, a eficácia no local da inflamação e dor, foi determinada pela injeção de uma substância irritante nas juntas do tornozelo de camundongos e medição da redução do inchaço em camundongos tratados com Univestin®, tal como descrito no Exemplo 19. Os resultados são apresentados na Figura 19.

[0133] Extratos padronizados individuais, que contêm concentrações de flavonóides de anel-B-Livre na faixa de 10-99% (com base em HPLC) e flavanos na faixa de 10-99% (com base em HPLC), bem como o produto Univestin® foram testados quanto à toxicidade em camundongos, com administração crônica e aguda (dados não-mostrados). No protocolo de administração crônica, os camundongos receberam os artigos de teste por administração oral, com doses diárias de 90 mg/kg (equivalente à dose diária humana de 500 mg), 450 mg/kg (cinco vezes o equivalente da dose diária) e 900 mg/kg (dez vezes o equivalente da dose diária). Os camundongos não apresentam efeitos adversos em termos de ganho de peso, aparência física ou comportamento. Resultados de necrópsia brutos não mostraram quaisquer anormalidade de órgãos e a histologia do estômago, rim e fígado não apresentou nenhuma diferença em comparação com camundongos de controle não-tratados. Testes de sangue integral, medindo eletrólitos, proteínas do sangue, enzimas do sangue e enzimas do fígado, não mostraram quaisquer anormalidades, em comparação com os camundongos de controle não-tratados. No protocolo agudo, extratos padronizados individuais contendo concentrações de flavonóides de anel-B-Livre na faixa de 10-99% (com base em HPLC) e flavanos na faixa de 10-99% (com base em HPLC), bem como o produto Univestin®, administrados a 2 gramas/kg (20 vezes o equivalente da dose diária) não apresentaram quaisquer anormalidades em ganho de peso, aparência, comportamento, nem na necrópsia bruta, aparência dos órgãos, histologia do estômago, rim e fígado ou no teste de san-

gue.

[0134] O Exemplo 20 descreve um estudo clínico realizado para avaliar a eficácia de Univestin® sobre o alívio da dor causada por artrite reumatóide ou osteoartrite do joelho e/ou quadril. O estudo era um estudo de centro único, randomizado, duplo cego, controlado por placebo. Sessenta indivíduos (n=60) com artrite reumatóide ou osteoartrite do joelho e/ou do quadril foram postos aleatoriamente em quatro grupos e tratados por 90 dias com um placebo, Univestin® (250 mg/dia ou 500 mg/dia) ou Celebrex® (também conhecido como celecoxib (200 mg/dia). O Univestin®, tal como mostrado no Exemplo 14, Tabela 11, consistiu em uma mistura patenteada de extrato padronizado de *Scutellaria baicalensis* Georgi, com um conteúdo de baicalina de 82,2% (p/p) e flavonóides de anel-B-Livre totais >90% (p/p) e um extrato padronizado de *Acacia catechu*, com um conteúdo total de flavano de 77,2% (p/p), em uma relação de 85:15. Celebrex® é um nome comercial para uma droga de prescrição que é um inibidor seletivo para COX-2. A Tabela 12 apresenta as notas do índice WOMAC para dor, rigidez e função antes do tratamento (notas da linha de base) e a 30, 60 e 90 dias. A Tabela 13 apresenta as mudanças absolutas nas notas do índice WOMAC para dor, rigidez e função após o tratamento por 30, 60 e 90 dias. As Figuras 20-31 representam graficamente os resultados desse estudo, traçando os intervalos de confiança de 95% para todos os dados.

[0135] Tal como mostrado nas Figuras 20 a 31, as notas compostas e sub-notas individuais de WOMAC, associadas a dor, rigidez e função física apresentaram melhoras significativas durante a administração de Univestin®, em comparação com o grupo de placebo. Além disso, Univestin® apresentou uma eficácia similar no alívio da dor, melhor eficácia em diminuir a rigidez e uma melhora acentuada da função física, em comparação com a droga de prescrição Celebrex®. A maior

importância pode ser vista na comparação de cada dose de Univestin® com o placebo e celecoxib no alívio de dor, rigidez e deficiência funcional, associada à osteoartrite ou artrite reumatóide.

[0136] Múltiplas comparações post-hoc para cada par do grupo de tratamento dentro de modelos de Análise de Variação mostraram que Univestin® a 500 mg/dia foi significativamente mais eficaz do que celecoxib a 200 mg/dia para a redução de dor causada por osteoartrite durante os 30 dias ($p=0,020$) de tratamento. Além disso, a administração de uma dose de 500 mg/dia de Univestin® também foi significativamente mais eficaz do que o placebo para a redução de dor dentro de 30 dias ($p=0,044$), 60 dias ($p=0,032$) e 90 dias ($p=0,001$) de tratamento. Celecoxib a 200 mg/dia mostrou importância para a redução de dor vs. o placebo a 60 dias ($p=0,009$) de tratamento. A 90 dias, a dose de 500 mg/dia de Univestin® mostrou uma eficácia significativamente mais alta se comparada com a dose de 250 mg/dia dentro de 90 dias ($p=0,038$) de tratamento.

[0137] Univestin® a 250 mg/dia foi significativamente mais eficaz do que o placebo para a redução de rigidez causada por osteoartrite, durante 30 dias ($p=0,00$), 60 dias ($p=0,027$) e 90 dias ($p=0,015$) de tratamento. Além disso, Univestin® a uma dose de 500 mg/dia foi significativamente mais eficaz do que o placebo para redução de rigidez causada por osteoartrite, dentro de 30 dias ($p=0,001$) e 90 dias ($p=0,005$) de tratamento. Celecoxib a 200 mg/dia mostrou significativamente mais eficácia do que o placebo para a redução de rigidez causada por osteoartrite, a apenas 30 dias de tratamento ($p=0,023$).

[0138] Para redução de deficiência funcional causada por osteoartrite, Univestin® foi significativamente mais eficaz do que celecoxib a 200 mg/dia dentro de 30 dias ($p=0,010$) de tratamento. Além disso, a administração de uma dose de 250 mg/dia de Univestin® também foi significativamente mais eficaz do que o placebo para a redução de de-

ficiência funcional causada por osteoartrite, dentro de 30 dias ($p=0,010$), 60 dias ($p=0,043$) e 90 dias ($p=0,039$) de tratamento. A dose de 500mg/dia de Uninvestin® foi mais eficaz do que celecoxib a 200 mg/dia, dentro de 30 dias ($p=0,015$), 60 dias ($p=0,043$) e 90 dias ($p=0,039$) de tratamento. Finalmente, a dose de 500 mg/ dia de Uninvestin® também foi significativamente mais eficaz do que placebo, para a redução de deficiência funcional causada osteoartrite, dentro de 30 dias ($p=0,015$), 60 dias ($p=0,016$) e 90 dias ($p=0,003$) de tratamento.

[0139] Esses resultados sugerem que Uninvestin®, particularmente a uma dosagem de 500 mg/dia, é muito mais eficaz do que o placebo e celecoxib em aliviar dor, rigidez e melhorar a deficiência funcional causada por osteoartrite. Além disso, Uninvestin® administrado a uma dosagem de 250 mg/ dia, também é muito eficaz para aliviar a rigidez e melhorar a deficiência funcional causada por osteoartrite, se comparado com o placebo e celecoxib. Celecoxib também mostrou apenas uma melhora marginal, geral, no alívio da dor, rigidez e deficiência funcional causada por osteoartrite.

[0140] Além dos efeitos de Uninvestin® sobre dor, rigidez e deficiência funcional causados por osteoartrite, o Exemplo 21 mostra um efeito mensurável de Uninvestin® sobre índice de massa corporal (BMI) e perda de peso. Embora não-limitado por teoria, esse efeito pode ser devido a um aumento de mobilidade, como resultado da administração de um antiinflamatório ou também pode ser devido a um mecanismo específico que aumenta o metabolismo ou reduz a utilização de gorduras e carboidratos no corpo. A Tabela 14 mostra o efeito de Uninvestin®, administrado a uma dose de 250 e 500 mg/dia, bem como celecoxib e placebo, sobre peso e BMI após 30 e 90 dias de tratamento. Os resultados são representados graficamente nas Figuras 32 e 33. Com referência às Figuras 32 e 33, pode ser visto que Uninvestin®,

administrado a uma dosagem tanto de 250 como de 500 mg/dia, resultou em uma queda significativa de peso e BMI depois de trinta dias, sendo que a perda de peso quase duplica após 90 dias. Celecoxib teve um efeito menor sobre peso e BMI, se comparado com Uninvestin®.

[0141] Múltiplas comparações post-hoc para cada par de grupos de tratamento com modelos de Análise de Variação também foram realizadas para perda de peso e BMI, tal como descrito no Exemplo 21. Essas análises mostraram que Uninvestin® a doses de 250 mg/dia e 500 mg/dia causou uma perda de peso estatisticamente significativa ($p=0,011$ vs. $p=0,118$) contra o placebo, após 30 dias de tratamento. Celecoxib não causou nenhuma perda de peso significativa contra placebo a 30 dias. A perda de peso continuou ao longo dos 90 dias de tratamento com Uninvestin®, a 250 mg/dia e 500 mg/dia, com importância estatística versus placebo ($p=0,001$ e $0,01$, respectivamente). Celecoxib ainda não mostrou importância em relação ao placebo. A diminuição de BMI seguiu tendências semelhantes para a dose de 250 mg/dia de Uninvestin®, que foi significativa em relação ao placebo após 30 dias ($p=0,008$), bem como a 90 dias ($p=0,001$). A dose de 500 mg/dia de Uninvestin® mostrou uma diminuição de BMI, sem importância estatística a 30 dias de tratamento. Porém, a diminuição de BMI atingiu importância estatística a 90 dias de tratamento ($p=0,011$). Novamente, após 90 dias de tratamento, o tratamento com o grupo celecoxib não mostrou alterações estaticamente significativas no BMI versus placebo.

[0142] O Exemplo 22 sugere que a administração de Uninvestin® pode afetar os níveis de glicose do sangue, bem como seu efeito sobre perda de peso e BMI. Diferenças mensuráveis em níveis de glicose do sangue são detectadas a 30 dias após iniciar o tratamento com Uninvestin®. A 90 dias, tanto os grupos tratados com 250 como os tratados com 500 mg/dia de Uninvestin® mostraram quedas significativas

nos níveis de glicose do sangue. O efeito de celecoxib sobre glicose do sangue foi menos dramático. Os resultados são apresentados nas Tabela 15 e representados graficamente na Figura 34.

[0143] Novamente foram realizadas comparações múltiplas post-hoc para cada par do grupo de tratamento com os modelos de Análise de Variação, também para glicose do sangue, tal como descrito no Exemplo 22. Apenas a dose de 500 mg/dia de Univestin® mostrou importância estatisticamente relevante versus o grupo de placebo (após 30 dias, $p=0,028$; após 90 dias, $p=0,022$). A dose de 250 mg/dia de Univestin®, no entanto, mostrou alterações clinicamente significativas nos níveis de glicose no sangue versus o placebo.

[0144] O depositante acredita que o Pedido U.S. Nº de Série 10/104.477, depositado em 22 de março de 2002, intitulado "Isolação de um Inibidor Dual de COX-2 e 5-Lipoxigenase de Acácia", é o primeiro relatório sobre uma composição de material isolado do gênero de plantas *Acacia*, que demonstra uma especificidade dual para COX-2 e 5-LO e que o Pedido U.S. Nº de Série 10/091,362, depositado em 1 de março de 2002, intitulado "Identificação de Flavonóides de anel-B-Livre como Potentes Inibidores de COX-2", é o primeiro relatório sobre uma correção entre a estrutura de flavonóides de anel-B-Livre e atividade inibitória de COX-2. Essas constatações levaram a uma nova mistura das duas classes de compostos específicos - flavonóides de anel-B-Livre e flavonas - para produzir uma composição de material, referida no presente como Univestin®, que pode ser usada para aliviar dor e rigidez das juntas, melhorar a mobilidade e a função física e evitar e tratar as condições patológicas de osteoartrite e artrite reumatóide.

[0145] Embora não-limitado por teoria, o mecanismo de ação identificado desta formulação acredita-se ser a inibição direta tanto da atividade de peroxidase da enzima COX-2 como a atividade da enzima 5-LO, junto com uma diminuição na produção de mRNA de cada uma

dessas enzimas. Univestin® também pode ser utilizado para evitar e tratar doenças e condições mediadas por COX-2 e 5-LO, inclusive, mas não-limitados a osteoartrite, artrite reumatóide, cólicas menstruais, arteriosclerose, ataque cardíaco, obesidade, diabetes, síndrome X, mal de Alzheimer, reação alérgica respiratória, insuficiência venosa crônica, hemorróidas, Eritromatose de Lupus Sistêmico, psoríase, dor de cabeça de tensão crônica, dores de cabeça de enxaqueca, doença intestinal inflamatória, infecções tópicas causadas por vírus, bactérias e fungos, queimadura solar, queimaduras térmicas, dermatite de contato, melanoma e carcinoma. Finalmente, em estudos clínicos humanos verificou-se que Univestin® pode causar perda de peso e reduzir o nível de glicose no sangue, devido à melhora da flexibilidade, mobilidade e aumento da atividade física.

[0146] A presente invenção também está voltada para composições terapêuticas que compreendem os agentes terapêuticos da presente invenção. Os agentes terapêuticos da presente invenção podem ser administrados por qualquer meio apropriado, inclusive, por exemplo, administração parenteral, tópica, oral ou local, tal como por via intradérmica, por injeção, ou por aerossol. O modo de administração em particular depende da doença a ser tratada. Está previsto que a administração dos agentes da presente invenção pode ser por intermédio de qualquer fluido corporal ou qualquer alvo ou qualquer tecido acessível através de um fluido corporal. Na modalidade preferida da invenção, o agente é administrado por injeção. Essa injeção pode ser administrada localmente em qualquer área afetada. Uma composição terapêutica pode ser administrada em uma pluralidade de formas de dosagem unitária dependendo do método de administração. Por exemplo, formas de dosagem unitárias, apropriadas para administração oral a um animal, incluem pós, comprimidos, pílulas e cápsulas. Métodos de distribuição preferidos para uma composição terapêutica da presente

invenção incluem administração intravenosa e administração local por, por exemplo, injeção ou administração tópica. Um (re)agente terapêutico da presente invenção pode ser administrado a qualquer animal, preferivelmente a mamíferos e, mais preferivelmente, a seres humanos.

[0147] Para modos de distribuição específicos, uma composição terapêutica da presente invenção pode ser formulada de modo a incluir outros componentes, tal como um excipiente farmaceuticamente aceitável, um adjuvante e/ou um veículo. Por exemplo, composições da presente invenção podem ser formuladas em um excipiente que o animal a ser tratado possa tolerar. Exemplos desses excipientes incluem, mas não-limitados a celulose, dióxido de silício, dextratos, sacarose, glicolato de amido de sódio, fosfato de cálcio, sulfato de cálcio, água, solução salina, solução de Ringer, solução de dextrose, manitol, solução de Hank e outras soluções de sais aquosas, fisiologicamente equilibradas. Veículos não-aquosos, tal como óleos fixos, óleo de gergelim, oleato de etila ou triglicerídeos também podem ser usados. Outras formulações úteis incluem suspensões, que contêm agentes que aumentam a viscosidade, tal como carboximetilcelulose de sódio, sorbitol ou dextrano. Os excipientes também podem conter quantidades secundárias de aditivos, tal como substâncias que aumentam a isotonicidade e a estabilidade química. Exemplos de tampões incluem tampão de fosfato, tampão de bicarbonato, tampão Tris, histidina, citrato e glicina, ou misturas dos mesmos, enquanto exemplos de conservantes incluem timerosal, m- ou o-cresol, formalina e benzil álcool. Formulações padrão podem ser injetáveis líquidos ou sólidos, que podem ser recebidos em um líquido apropriado como uma suspensão ou solução para injeção. Desse modo, em uma formulação não-líquida, o excipiente pode compreender dextrose, albumina de soro humano, conservantes etc., aos quais pode ser adicionada água estéril ou solução sa-

lina antes da administração.

[0148] Em uma modalidade da presente invenção, a composição também pode incluir um adjuvante ou um veículo. Adjuvantes são, tipicamente, substâncias que geralmente intensificam a função da fórmula em evitar e tratar indicações associadas e caminhos de COX e LO. Adjuvantes apropriados incluem, mas não estão limitados a adjuvante de Freund; outros componentes de parede celular bacteriana; sais baseados em alumínio; sais baseados em cálcio; sílica, boro, histidina, sulfatos de glucosamina, sulfato de condroitina, gluconato de cobre, polinucleotídeos; vitamina D, vitamina K, toxóides; cartilagem de tubarão e bovina; proteínas de soro; proteínas de revestimento viral; outras preparações derivadas de bactérias; gama interferona; adjuvantes de copolímero de bloco, tal como adjuvante de Hunter Titermax (Vaxcel.TM., Inc. Norcross, Ga); adjuvantes de Ribi (obteníveis de Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont); e saponinas e seus derivados, tal como Quil A (obtenível de Superfos Biosector A/S, Dinamarca). Veículos são, tipicamente, compostos que aumentam a meia-vida de uma composição terapêutica no animal tratado. Veículos apropriados incluem, mas não estão limitados a formulações poliméricas de liberação controlada, implantes biodegradáveis, lipossomas, bactérias, vírus, óleos, ésteres e glicóis.

[0149] Uma modalidade da presente invenção é uma formulação de liberação controlada, que é capaz de liberar lentamente uma composição da presente invenção em um animal. Tal como usada no presente, uma formulação de liberação controlada compreende uma composição da presente invenção em um veículo de liberação controlada. Veículos de liberação controlada apropriados incluem, mas não estão limitados a polímeros biocompatíveis, outras matrizes poliméricas, cápsulas, microcápsulas, micropartículas, preparações de bolus, bombas osmóticas, dispositivos de difusão, lipossomas, liposferas e

sistemas de distribuição transdérmica. Outras formulações de liberação controlada da presente invenção incluem líquido que, ao ser administrados a um animal, formam um sólido ou um gel *in situ*. Formulações de liberação controlada preferidas são biodegradáveis (isto é, bioerodíveis).

[0150] Uma vez formulada, a composição terapêutica pode ser armazenada em frascos estéreis como solução, suspensão, gel, emulsão, sólido ou pó desidratado ou liofilizado; ou ser transformado diretamente em cápsulas e/ou comprimidos com outros veículos inertes, para administração oral. Essas formulações podem ser armazenadas ou em forma pronta para uso ou necessitando reconstituição imediatamente antes da administração. O modo de administrar formulações que contêm composições para distribuição sistêmica, pode ser por via oral, subcutânea, intramuscular, intravenosa, intranasal ou por supositório vaginal ou retal.

[0151] A quantidade da composição que é eficaz no tratamento de um distúrbio ou condição específica depende da natureza do distúrbio ou condição, que pode ser determinado por técnicas clínicas usuais. Além disso, testes *in vitro* ou *in vivo* podem ser opcionalmente usados, para ajudar a identificar limites de dosagem ótimos. A dose precisa a ser usada na formulação também depende da via de administração e da gravidade ou avanço da doença ou condição e deve ser decidida de acordo com o médico nas circunstâncias de cada paciente. Doses eficazes podem ser extrapoladas de curvas de dose-resposta derivadas de sistema de teste *in vitro* ou de modelos animais. Por exemplo, uma quantidade eficaz da composição pode ser facilmente determinada administrando doses graduadas da composição e observando o efeito desejado.

[0152] O método de tratamento de acordo com a presente invenção compreende administrar internamente ou topicamente a um paci-

ente que necessite da mesma, uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição, que consiste em uma mistura de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos. A pureza da mistura inclui, mas não está limitada a 0,01% a 100%, dependendo da metodologia usada para obter o(s) composto(s). Em uma modalidade preferida, doses da mistura de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos e composições farmacêuticas que contêm os mesmos são uma quantidade eficaz, não tóxica, geralmente escolhida da faixa de 0,01 a 200 mg/kg de peso corporal. Pessoas versadas na técnica, usando testes clínicos de rotina, estão aptas a determinar as doses ótimas para a doença específica que está sendo tratada.

[0153] Os exemplos abaixo são fornecidos apenas para fins explicativos e não se destinam a limitar o alcance da invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Preparação de Extratos Orgânicos e Aquosos de Plantas de Acacia e Scutellaria

[0154] Material vegetal de cascas de *Acacia catechu* (L) Willd., raízes de *Scutellaria orthocalyx*, raízes de *Scutellaria baicalensis* ou a planta inteira de *Scutellaria lateriflora* foi triturado para um tamanho de partícula não maior que 2 mm. O material vegetal triturado seco (60) foi depois transferido para um balão de *Erlenmeyer* e foi adicionado metano:diclorometano (1:1) (600 mL). A mistura foi sacudida por uma hora, filtrada e a biomassa foi novamente extraída com metanol:diclorometano (1:1) (600 mL). Os extratos orgânicos foram combinados e evaporados sob vácuo, para obter o extrato orgânico (veja Tabela 1 abaixo). Após a extração orgânica, a biomassa foi secada ao ar e extraída uma vez com água ultra-pura (600 mL). A solução aquosa foi filtrada e secada por congelação para fornecer o extrato aquoso (veja Tabela 1 abaixo).

Tabela 1. Rendimento de Extratos Orgânicos e Aquosos de Espécies

de *Acacia* e *Scutellaria*

Fonte vegetal	Quantidade	Extrato Orgânico	Extrato Aquoso
cascas de <i>Acacia catechu</i>	60 g	27,2 g	10,8 g
raízes de <i>Scutellaria orthocalyx</i>	60 g	4,04 g	8,95 g
Raízes de <i>Scutellaria baicalensis</i>	60 g	9,18 g	7,18 g
<i>Scutellaria lateriflora</i> (planta inteira)	60 g	6,54 g	4,08 g

Exemplo 2. Inibição da Atividade de Peroxidase de COX-2 e COX-1 por Extratos de plantas de *Acacia catechu*, Diversas Espécies de *Scutellaria* e Outras Plantas

[0155] O bioensaio voltado para processos de detecção para a identificação de inibidores de COX-2 específicos foi elaborado para testar a atividade de peroxidase da enzima tal como descrito abaixo.

[0156] **Teste de Peroxidase.** O teste para detectar inibidores de COX-2 foi modificado para uma plataforma de alta produção (Raz). Em resumo, COX-2 ovino recombinante (Cayman) em tampão de peroxidase (100 mM de TBS, 5 mM de EDTA, 1 μ M de Heme, 1 mg de epinefrina, 0,094% de fenol) foi incubado com extrato diluição (1:500) por 15 minutos. Substrato de Quantablu (Pierce) foi adicionado e deixado desenvolver-se por 45 minutos a 25°C. Depois foi lida a luminescência usando uma leitora de placa Victor 2 de Wallac. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

[0157] A Tabela 2 apresenta a inibição da enzima pelos extratos orgânicos e aquosos obtidos de cinco espécies de plantas, inclusive a casca da *Acacia catechu*, raízes de duas espécies de *Scutellaria* e extratos de três outras espécies de plantas, que consistem em flavonóides de anel-B-Livre estruturalmente semelhantes. Os dados são apresentados como o percentual de atividade de peroxidase em relação à enzima COX-2 ovina recombinante e apenas o substrato. A inibição percentual pelo extrato orgânico variou de 30% a 90%.

Tabela 2. Inibição de Atividade de Peroxidase de COX-2 por diversas espécies

Fonte vegetal	Inibição de COX-2 por extrato orgânico	Inibição de COX-2 por extrato aquoso
<i>Acacia catechu</i> (cascas)	75%	30%
<i>Scutellaria orthocalyx</i> (raízes)	55%	77%
<i>Scutellaria baicalensis</i> (raízes)	75%	0%
<i>Desmodium sambuense</i> (planta inteira)	55%	39%
<i>Eucalyptus globulos</i> (folhas)	30%	10%
<i>Murica nana</i> (folhas)	90%	0%

[0158] A comparação da inibição relativa das isoformas de COX-1 e COX-2 requer a geração de valores de IC₅₀ para cada uma dessas enzimas. O IC₅₀ é definido como a concentração na qual é obtida 50% de inibição da atividade enzimática em relação ao controle por um inibidor específico. Nesses testes, verificou-se que os valores de IC₅₀ variam de 6 a 50 µg/mL e 7 a 80 µg/mL para as enzimas COX-2 e COX-1, respectivamente, tal como apresentado na Tabela 3. A comparação dos valores de IC₅₀ de COX-2 e COX-1 demonstra a especificidade dos extratos orgânicos das diversas plantas para cada uma dessas enzimas. O extrato orgânico de *Scutellaria lateriflora*, por exemplo, mostra uma inibição preferencial de COX-2 sobre COX-1, com valores de IC₅₀ de 30 e 80 µg/mL, respectivamente. Enquanto alguns extratos demonstram uma inibição preferencial de COX-2, outros não o fazem. O exame das frações de HTP e compostos purificados dessas frações é necessário determinar a especificidade efetiva de inibição para esses extratos e compostos.

Tabela 3. Valores de Extratos Orgânicos para COX-2 e COX-1 Humano e Ovino

Fonte Vegetal	IC ₅₀ COX-2 Humano (µg/mL)	IC ₅₀ COX-2 Ovino (µg/mL)	IC ₅₀ COX-1 Ovino (µg/mL)
<i>Acacia catechu</i> (cascas)	3	6,25	2,5
<i>Scutellaria orthocalyx</i> (raízes)	não feito	10	10
<i>Scutellaria baicalensis</i> (raízes)	30	20	20
<i>Scutellaria lateriflora</i> (planta inteira)	20	30	80
<i>Eucalyptus globulos</i> (folhas)	não feito	50	50
<i>Murica nana</i> (folhas)	5	6	7

Exemplo 3. Fracionamento de HTP de Extratos Ativos

[0159] O extrato orgânico (400 mg) de planta ativa foi carregado em uma coluna flash pré-enchida (2 cm ID x 8,2 cm, 10 g de sílica-gel). A coluna foi extraída usando um sistema de purificação de alta produção Hitachi (HTP), com um fase móvel de gradiente de (A) 50:50 de EtOAc:hexano e (B) metanol de 100% de A para 100% de B em 30 minutos, a uma velocidade de corrente de 5 mL/min. A separação foi monitorada usando um detector de UV de comprimento de onda de banda larga e as frações foram coletadas em uma placa de 96 cavidades a 1,9 mL/cavidade usando um coletor de frações Gilson. A placa de amostras foi secada sob vácuo baixo e centrifugação. DMSO (1,5 mL) foi usado para dissolver as amostras em cada célula e uma parte (100 µL) foi tirada para o teste de inibição de COX.

[0160] O extrato aquoso (750 mg) de planta ativa foi dissolvido em água (5 mL), filtrado através de um filtro de seringa de 1 µm e transferido para um frasco de 4 mL de Cromatografia de Líquido de Alta Pressão (HPLC). A solução foi depois injetada por um autosampler sobre uma coluna de fase inversa pré-enchida (C-18, 15 µm de tamanho de partícula, 2,5 cm ID e 10 cm com inserção de pré-coluna). A coluna foi extraída usando um sistema de purificação de alta produção Hitachi (HTP), com uma fase móvel de gradiente de (A) água e (B) metanol de 100% A para 100% B em 20 minutos, seguido de 100% de metanol por 5 minutos, a uma velocidade de corrente de 10 mL/min. A separação foi monitorada usando um detector de UV de comprimento de onda de banda larga e as frações foram coletadas em uma placa de 96 cavidades a 1,9 mL/ cavidade usando um coletor de frações Gilson. A placa de amostras foi secada por congelamento. Água ultra-pura (1,5 mL) foi usada para dissolver as amostras em cada célula e uma parte (100 µL) foi tirada para o teste de inibição de COX.

Exemplo 4. Inibição de Atividade de Peroxidase de COX-2 por Frações

de HTP de Espécies de *Acacia* e *Scutellaria*

[0161] Extratos orgânicos bioativos individuais foram caracterizados adicionalmente examinando cada uma das frações de HTP quanto à capacidade em inibir a atividade de peroxidase das enzimas recombinantes, tanto de COX-1 como de COX-2. Os resultados são apresentados nas Figuras 1 e 2, que mostram a inibição da atividade de COX-2 e COX-1 por frações de HTP de extratos orgânicos da casca de *Acacia catechu* e das raízes de *Scutellaria baicalensis*, isolados tal como descrito nos Exemplos 1 e 3 e testados tal como descrito no Exemplo 2. Os perfis mostrados nas Figuras 1 e 2 mostram múltiplos picos de inibição, que indicam componentes ativos múltiplos em cada extrato. Diversos picos ativos são muito seletivos para COX-2. Outros *Scutellaria* sp., inclusive *Scutellaria orthocalyx* e *Scutellaria lateriflora* demonstram um pico similar de inibição (dados não-mostrados). Porém, as duas enzimas COX-1 e COX-2 demonstram picos múltiplos de inibição, sugerindo que existe mais de uma molécula contribuindo para os perfis de inibição iniciais.

Exemplo 5. Isolação e Purificação dos Flavonóides de Anel-B-Livre do Extrato Orgânico de *Scutellaria*

[0162] O extrato orgânico (5 g) das raízes de *Scutellaria orthocalyx*, isolado tal como descrito no Exemplo 1, foi carregado em uma coluna e flah pré-enchida (120 g de sílica, 40 µm de tamanho de partícula 32-60 µm, 25 cm x 4 cm) e extraído com uma fase móvel de gradiente de (A) 50:50 EtAc:hexano e (B) metanol, de 100% A para 100B em 60 minutos, a uma velocidade de corrente de 15 mL/min. As frações foram coletadas em tubos de teste a 10 mL/fração. O solvente foi evaporado sob vácuo e a amostra em cada fração foi dissolvida em 1 mL de DMSO e uma alíquota de 20 µL foi transferida para uma placa de disco rasa de 96 cavidades e testada quanto à atividade inibitória de COX. Com base nos resultados do teste de COX, as frações ativas

Nº 31 a Nº 39 foram combinadas e evaporadas. A análise por HPLC/PDA e LC/EM mostrou um composto principal com tempos de retenção de 8,9 minutos e um pico de EM a 272 m/e. O produto foi purificado adicionalmente em uma coluna de semi-preparação C18 (25 cm x 1 cm), com uma fase móvel de gradiente de (A) água e (B) metanol, por um período de 45 minutos, a uma velocidade de corrente de 5 mL/minuto. Oitenta e oito frações foram coletadas para produzir 5,6 mg de um sólido amarelo-claro. A pureza foi determinada por HPLC/PDA e LC/EM e comparada com padrões e dados de RMN. ^1RMN δ ppm. (DMSO- d_6) 8,088 (2H, m H-3',5'), 7,577 (3H, m, H-2',4',6'), 6,932 (1H, s, H-8), 6,613 (1H, s, H-3), MS: $[M+1]^+ = 271\text{m/e}$.

[0163] O composto foi identificado como baicaleína. O IC_{50} de baicaleína contra a enzima de COX-2 foi determinado como sendo 10 $\mu\text{g/mL}$.

[0164] Usando cromatografia de coluna C-18 preparativa, outros flavonóides de anel-B-Livre foram isolados e identificados usando um extrato padronizado isolado das raízes de *Scutellaria Baicalensis* (batelada Nº RM052302-01), com um conteúdo de flavonóides de anel-B-Livre de 82,2%. Onze estruturas foram analisadas usando HPLC/PDA/EM, tal como representado na Figura 3. Com referência à Figura 3, os onze compostos identificados eram baicalina, wogonina-7-glucoronida, oroxilina A 7-glucoronida, baicaleína, wogonina, crisina-7-glucoronida, 5-metilawogonina-7-glucoronida, scutellarina, norwogonina, crisina e oroxilina A.

Exemplo 6. Inibição de COX de Flavonóides de Anel-B-Livre Purificados

[0165] Diversos flavonóides de anel-B-Livre foram obtidos e testados a uma concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ quanto à atividade inibitória de COX-2 usando os métodos descritos no Exemplo 2. Os resultados estão resumidos na Tabela 4.

[0166] A medição do IC_{50} de baicaleína, baicalina e um extrato de

flavonóides de anel-B-Livre padronizado, isolado das raízes de *Scutellaria baicalensis*, foi realizada usando o seguinte método. Um cromóforo de peróxido divisível foi incluído no teste, para visualizar a atividade de peroxidase de cada enzima na presença de ácido araquidônico como co-fator. Tipicamente, os testes foram realizados em um formato de 96 cavidades. Cada inibidor, tirado de uma matéria-prima de 10 mg/mL em 100% de DMSO, foi testado em triplicata à temperatura ambiente usando a seguinte faixa de concentrações: 0, 0,1, 1, 5, 10, 20, 50, 100 e 500 µg/mL. A cada vão foram adicionados 150 µL de 100 mM de Tris-HCl, pH 7,5, junto com 10 µL de 22 µM de hematina diluídos em tampão tris, 10 µL de inibidor diluídos em DMSO e 25 unidades de cada enzima COX-1 e COX-2. Os componentes foram misturados por 10 segundos em uma plataforma rotativa, após o que foram adicionados dicloridrato de 20 µL de 2mM de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamina (TMPD) e 20 µL de 1,1 mM de AA, para iniciar a reação. A placa foi sacudida por 10 segundos e depois incubada por 5 minutos, antes da absorção ser lida em 570 nm. A concentração de inibidor vs. inibição percentual foi traçada e o IC₅₀ foi determinado tomando o ponto semi-máximo ao longo do isoterme e fazendo a intersecção da concentração no eixo x. O IC₅₀ foi depois normalizado para o número de unidades de enzima no teste. A resposta da dose e resultados de IC₅₀ para baicaleína, baicalina e um extrato de flavonóides de anel-B-Livre padronizado, isolado das raízes de *Scutellaria baicalensis* são apresentados nas Figuras 4, 5 e 6, respectivamente.

Tabela 4. Inibição da Atividade Enzimática de COX por Flavonóides de Anel-B-Livre purificados

Flavonóides de Anel-B-Livre	Inibição de COX-1	Inibição de COX-2
Baicaleína	107%	109%
5,6-Diidróxi-7-metoxiflavona	75%	59%
7,8-diidroxi-7-metoxiflavona	74%	63%
Baicalina	95%	97%
Wogonina	16%	12%

Exemplo 7. Quantificação de Flavonóides de Anel-B-Livre em Extratos Ativos Isolados de *Scutellaria orthocalyx* (raízes), *scutellaria baicalensis* (raízes) e *Oroxylum indicum* (sementes)

[0167] A presença e a quantidade de flavonóides de anel-B-Livre em cinco extratos ativos isolados de três espécies de planta diferentes foram confirmadas e estão apresentados na Tabela 5. Os flavonóides de anel-B-Livre foram analisados quantitativamente por HPLC usando uma coluna Luna C-18 (250 x 4,5 mm, 5 µm), usando 1% de ácido fosfórico e gradiente de acetonitrila de 80% a 20% em 22 minutos. Os flavonóides de anel-B-Livre foram detectados usando um detector de UV a 254 nm e identificados com base no tempo de retenção por comparação com padrões de flavonóides de anel-B-Livre.

Tabela 5. Conteúdo de Flavonóides de Anel-B-Livre em Extratos De plantas Ativos

Extratos Ativos	Peso do Extrato	% Extraíveis da Biomassa	Quantidade total de Flavonóides de anel-B-Livre	% de Flavonóides de anel-B-livre no extrato
<i>S. orthocalyx</i> (extrato aquoso)	8,95 g	14,9 g	0,2 mg	0,6%
<i>S. orthocalyx</i> (extrato orgânico)	3,43 g	5,7%	1,95 mg	6,4%
<i>S. baicalensis</i> (extrato aquoso)	7,18 g	12,0%	0,03 mg	0,07%
<i>S. Baicalensis</i> (extrato orgânico)	9,18 g	15,3%	20,3 mg	35,5%
<i>Oroxylum indicum</i> (extrato orgânico)	6,58 g	11,0%	0,4 mg	2,2%

Exemplo 8. Isolação e Purificação de Compostos Ativos do Extrato Orgânico de *Acacia catechu*

[0168] O extrato orgânico (5 g) das raízes de *A. catechu* isolado tal como descrito no Exemplo 1, foi carregado em uma coluna de flash pré-enchida (120 g de sílica, 40 µm de tamanho de partículas 32-60 µm, 25 cm - 4 cm) e extraída com uma fase móvel de gradiente de (A) 50:50 de ETOAc: hexano e (B) metanol de 100% de A a 100% de B, em 60 mi-

nutos, a uma velocidade de corrente de 15 mL/min. As frações foram coletadas em tubos de teste a 10 mL/fração. O solvente foi evaporado sob vácuo e a amostra em cada fração foi dissolvida em DMSO (1 mL) e uma alíquota de 20 µl foi transferida para uma placa de disco rasa, de 96 cavidades e testada quanto à atividade inibitória de COX. Com base nos resultados do teste de COX, as frações ativas Nº 32 a Nº 41 foram combinadas e evaporadas, para dar 2,6 g de sólido. A análise por HPLC/PDA e LC/EM mostrou dois componentes principais, com tempos de retenção de 15,8 e 16,1 minutos, respectivamente. O produto foi purificado adicionalmente em uma coluna semipreparatória C18 (25 cm x 1 cm), carregada com 212,4 mg de produto e extraída com uma fase móvel de gradiente de (A) água e (B) acetonitrila (ACN) por um período de 60 minutos, a uma velocidade de corrente de 5 mL/minuto. Oitenta e oito frações foram coletadas e dois compostos ativos foram isolados - Composto 1 (11,5 mg) e Composto 2 (16,6 mg). A pureza foi determinada por dados de HPLC/PDA e LC/EM em comparação com padrões (catequina e epicatequina) e dados de RMN.

[0169] **Composto 1.** ^{13}C RMN: δ ppm (DMSO- d_6) 27,84 (C4), 66,27 (C3), 80,96 (C2), 93,78 (C9), 95,05 (C7), 99,00 (C5), 114,48 (C12), 115,01 (C15), 118,36 (C16), 130,55 (C11), 144,79 (C14), 155,31 (C6), 156,12 (C10), 156,41 (C8). 1h rmn: δ ppm (DMSO- d_6) 9,150 (1H, s, OH), 8,911 (1H, s, OH), 8,835 (1H, s, OH), 6,706 (1H, d, $J=2$ Hz, H2'), 6,670 (1H, d, $J=8,0$ Hz, H-6'), 6,578 (1H, dd, $J=2,8$ Hz, H-5'), 5,873 (1H, d, $J=2$ Hz, H8), 5,670 (1H, d, $J=2$ Hz, H6), 4,839 (1H, d, $J=4$ Hz, OH), 4,461 (1H, d, $J=7,3$ Hz, H2), 3,798 (1H, m, H3), 2,625 (1H, m, H4b), 2,490 (1H, m, H4a). EM: $[M+1]^+ = 291$ m/e. Esse composto foi identificado como catequina.

[0170] **Composto 2.** ^{13}C RMN: δ ppm (DMSO- d_6) 28,17 (C4), 64,87 (C3), 78,02 (C2), 94,03 (C9), 95,02 (C7), 98,44 (C5), 114,70 (C12), 114,85 (C15), 117,90 (C16), 130,56 (C11), 144,39 (C14), 155,72 (C6),

156,19 (C10), 156,48 (C8). ¹H RMN: δ ppm (DMSO-*d*₆) 9,083 (1H, s, OH), 8,873 (1H, s, OH), 8,777 (1H, s, OH), 8,694 (1H, s, OH), 6,876 (1H, d, J=2 Hz, H2'), 6,646 (2H, s, H-5', 6'), 5,876 (1H, d, J=2 Hz, H8), 5,700 (1H, d, J=2 Hz, H6), 4,718 (1H, s, OH), 4,640 (1H, d, J=4,5 Hz, H2), 3,987 (1H, d, J=4,5 Hz, H3), 2,663 (1H, dd, J=4,6, 6,3 Hz, H4b), 2,463 (1H, dd, J=4,6, 6,3 Hz, H4a). EM: $[M+1]^+ = 291$ m/e. Esse composto foi identificado como epicatequina.

[0171] A resposta à dose e resultados de IC₅₀ para catequina e um extrato de flavano padronizado, isolado da casca de *A. catechu*, são mostrados nas Figuras 7 e 8, usando o método descrito no Exemplo 6. Os valores de IC₅₀ de epicatequina contra as enzimas COX-1 e COX-2 são 7 µg/mL e 20 µg/mL, respectivamente.

Exemplo 9. Quantificação por HPLC de Extratos Ativos de *Acacia catechu*

[0172] O conteúdo de flavano nos extratos orgânicos e aquosos isolados de *Acacia catechu* foi quantificado por HPLC usando um detector de PhotoDiode Array (HPLC/PDA) e uma coluna C18 Luna (250 mm x 4,6 mm). Os flavanos foram extraídos da coluna usando um gradiente de acetonitrila de 10% a 30% de ACN por um período de 20 minutos, seguido de 60% de ACN por cinco minutos. Os resultados são apresentados na Tabela 6. Um perfil da purificação de HPLC é mostrado na Figura 9. Os flavanos foram quantificados com base no tempo de retenção e dados de PDA usando catequina e epicatequina como padrões. Os tempos de retenção para os dois flavanos principais foram 12,73 minutos e 15,76 minutos, respectivamente.

Tabela 6. Conteúdo de Flavonóides de Anel-B-Livre em Extratos de Plantas Ativos

Extratos ativos de casca de <i>A. catechu</i>	Peso do extrato	% Extraíveis de Biomassa	% de Flavanos no Extrato
Extrato aquoso	10,8 g	18,0%	0,998%
Extrato orgânico	27,2 g	45,3%	30,37%

Exemplo 10. Estudo in vitro da Atividade Inibitória de COX de Extratos Orgânicos das Espécies de *Acacia catechu* e *Scutellaria*

[0173] A eficácia in vitro e a especificidade para COX-2 de extratos orgânicos isolados de espécies de *Acacia* e de várias espécies de *Scutellaria* foram testadas em sistemas baseados em células quanto à sua capacidade em inibir a geração de metabólitos de AA. Linhas de células HOSC, que constitutivamente expressam COX-2 e THP-1, que expressa COX-1, foram testadas quanto à sua capacidade de gerar PGE₂ na presença de AA.

[0174] **Teste de COX-2 Baseado em Células.** Células de HOSC (ATCC#8304-CRL) foram cultivadas para uma confluência de 80-90%. As células foram tripsinizadas, lavadas e ressuspensas em 10 mL, a 1×10^6 células/mL em meio de cultura de tecidos (MEM). A suspensão de células (200 µL) foi distribuída em placas de cultura de tecidos de 96 cavidades e incubada por 2 horas a 37°C e 5% de CO₂. O meio foi então substituído com meio de HOSC novo contendo 1 ng/mL de IL-1b e incubado durante a noite. O meio foi novamente removido e substituído com 190 µL de meio de HOSC. Os compostos de teste foram então adicionados em 10 µL do meio de HOSC e foram incubados por 15 minutos a 37°C. Foi adicionado ácido araquidônico em meio de HOSC (20 µL, 100 µM) e a mistura foi incubada por 10 minutos em um agitador à temperatura ambiente. O material sobrenadante (20 µL) foi transferido para novas placas que continham 190 µL/cavidade de 100 µM de indometacina em tampão de ELISA. Os materiais sobrenadantes foram analisados por ELISA, tal como descrito abaixo.

[0175] **Teste de COX-1 Baseado em Células.** Células de THP-1 foram suspensas para um volume de 30 mL (5×10^5 células/mL). TPA foi adicionado para uma concentração final de 10 nM de TPA e cultivadas por 48 horas, para diferenciar células para macrófagos (aderen-

tes). As células foram ressuspensas em HBSS (25 mL) e adicionadas a placas de 96 cavidades em volumes de 200 µL a 5×10^5 células/cavidade. Os compostos de teste em RPMI 1640 (10 µL) foram depois adicionados e incubados por 15 minutos a 37°C. Ácido araquidônico em RPMI (20 µL) foi depois adicionado e a mistura foi incubada por 10 minutos em um agitador à temperatura ambiente. O material sobrenadante (20 µL) foi adicionado ao tampão de ELISA (190 µL) contendo indometacina (100 µM). Os materiais sobrenadantes foram depois analisados por ELISA, tal como descrito abaixo.

[0176] **Teste de COX-2 de Sangue Integral.** Sangue periférico de doadores saudáveis, normais, foi coletado por venopunção. O sangue integral (500 µL) foi incubado com compostos de teste e extratos por 15 minutos a 37°C. Foi adicionado lipopolissacarídeo (LPS, de *E. coli*, sorotipo 0111:B4) para uma concentração final de 100 µg/mL e cultivado durante a noite a 37°C. O sangue foi centrifugado (12.000 x g) e o plasma foi coletado. O plasma (100 µL) foi adicionado a metanol (400 µL) para precipitar as proteínas. Os materiais sobrenadantes foram medidos para produção de PGE₂ por ELISA. Esse processo é uma modificação dos métodos descritos por Brideau et al. (1996) *Inflamm. Res.* 45:68-74.

[0177] **Teste de COX-1 de Sangue Integral.** Sangue fresco foi coletado em tubos que não continham anticoagulantes e imediatamente dividido em frações de 500 µL em tubos de microcentrífuga siliconizados. Foram adicionadas amostras de teste, centrifugadas e deixadas coagular-se por 1 hora a 37°C. As amostras foram depois centrifugadas (12.000 x g) e o plasma foi coletado. O plasma (100 µL) foi adicionado a metanol (400 µL) para precipitar as proteínas. Os materiais sobrenadantes foram medidos para produção de TXB₂ por ELISA. Esse processo é uma modificação dos métodos descritos por Brideau et

al. (1996) *Inflamm. Res.* 45:68-74.

[0178] **Testes de ELISA.** Placas Immunolon-4 ELISA foram revestida com anticorpos de captura 0,5-4 µg/mL em tampão de carbonato (pH 9,2) durante a noite a 4°C. As placas foram lavadas e incubadas por 2 horas com tampão de bloqueamento (PBS + 1% BSA) à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e amostras de teste (100 µL) foram adicionadas e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, durante agitação. Anticorpo secundário conjugado à peroxidase foi adicionado em um volume de 50 µl, contendo 0,5-4 mg e incubado por 1 hora à temperatura ambiente, durante agitação. As placas foram então lavadas três vezes e substrato de TMB (100 µL) foi adicionado. As placas foram deixadas desenvolver-se por 30 minutos, após o que a reação foi interrompida pela adição de 1M de ácido fosfórico (100 µL). As placas foram depois lidas a 450 nm, usando um leitor de placas Wallac Victor 2.

[0179] **Citotoxicidade.** A citotoxicidade celular foi testada usando um kit colorimétrico (oxford Biochemical Research), que mede a liberação de desidrogenase de lactato em células danificadas. Os testes foram completados de acordo com instruções do fabricante. Foram testados tanto os flavanos como o extrato padronizado de *Acacia catechu*. Não foi observada qualquer citotoxicidade para nenhum dos compostos testados.

[0180] Os resultados dos testes são apresentados na Tabela 7. Os dados são apresentados como valores de IC₅₀ para comparação direta. Com referência à Tabela 5, os valores de IC₅ geralmente são mais baixos para COX-1 do que para COX-2. Adicionalmente, também foi medido sangue integral, quanto à inibição diferencial da geração de PGE₂ (uma medida de COX-2 nesse sistema) ou trombosano B2 (TXB₂) (uma medida de ativação de COX-1). Com referência à Tabela 7, esses estudos demonstram claramente especificidade para inibição

de COX-2 nos testes baseados em células de sangue integral. Porém, estudos que usaram o sistema de modelo baseado em THP-1 e HOSC, na verdade, mostraram uma seletividade maior para COX-1. Possíveis razões para essa discrepância são as diferenças fundamentais entre linhas de células imortalizadas, que expressam constitutivamente cada uma das enzimas e células primárias derivadas do sangue integral, que são induzidas a expressar enzimas COX. Células primárias são um modelo mais relevante para estudar inflamação *in vivo*. Além disso, os compostos usados para identificar atividade de COX-1 vs. COX-2 variam em cada um desses sistemas e, conseqüentemente, não são comparáveis diretamente.

Tabela 7. Inibição da Atividade de COX em Sistemas Celulares por Extratos Orgânicos

Fonte vegetal dos extratos orgânicos	Teste Baseado em linhas de células		Teste de Sangue integral	
	IC ₅₀ COX-2	IC ₅₀ COX-1	IC ₅₀ COX-2	IC ₅₀ COX-1
<i>A. catechu</i> (cascas)	78 µg/mL	22 µg/mL	40 µg/mL	>50 µg/mL
<i>S. orthocalyx</i> (raízes)	50 µg/mL	18 µg/mL	10 µg/mL	>50 µg/mL
<i>S. baicalensis</i> (raízes)	82 µg/mL	40 µg/mL	20 µg/mL	8 µg/mL
<i>S. lateriflora</i> (planta inteira)	60 µg/mL	30 µg/mL	8 µg/mL	20 µg/mL

Exemplo 11. Inibição de 5-Lipoxigenase pela Catequina de Acácia Catechu

[0181] Tal como observado acima, um dos caminhos mais importantes envolvido na resposta inflamatória é produzido por lipoxigenases, non-heme, que contêm ferro (5-LO, 12-LO e 15-LO), que catalisam a adição de oxigênio molecular sobre ácidos graxos, tal como AA (AA), para produzir os hidroperóxidos 5-, 12- e 15-HPETE, que são depois convertido em leucotrienos. Houve indicações anteriores de que o extrato de flavano de *A. catechu* pode oferecer algum grau de inibição de 5-LO, desse modo evitando a formação de 5-HPETE. Um

Kit de Teste de Detecção de Inibidores de Lipoxigenase (Cayman Chemical, Inc. Ct# 760700) foi usado para testar se catequina de flavano purificada de *Acacia catechu* inibia diretamente 5-LO in vitro. O 15-LO de grãos de soja normalmente usado no kit foi substituído por 5-LO de batata, após ter sido realizada uma troca de tampão de fosfato para um tampão baseado em tris, usando microfiltração. Esse teste detecta a formação de hidroperóxidos através de um cromogênio detector de oxigênio. Em resumo, o teste foi realizado em triplicata pela adição de 90 µl de 0,17 unidades/µl de 5-LO de batata, 20 µl de 1,1 mM de AA, 100 µl de cromogênio detector de oxigênio e 10 µl de inibidor de flavano purificado, para concentrações finais variando de 0 a 500 µl/mL. O IC₅₀ para inibição de 5-LO pela catequina foi determinado como sendo 1,38 µl/mL/unidade de enzima.

Exemplo 12. Preparação de um Extrato Padronizado de *Acacia catechu*

[0182] *Acacia catechu* (500 mg de casca triturada) foi extraída com os seguintes sistemas de solvente. (1) 100% de água, (2) 80:20 água:metanol, (3) 60:40 água:metanol, (4) 40:60 água:metanol, (5) 20:80 água:metanol, (6) 100% de metanol, (7) 80:20 metanol:THF, (8) 60:40 metanol:THF. Os extratos foram concentrados e secados sob vácuo baixo. A identificação dos componentes químicos em cada extrato foi obtida por HPLC usando um detector PhotoDiode Array (HPLC/PDA) e uma coluna C18 de 250 mm x 4,6 mm. Os componentes químicos foram quantificados com base no tempo de retenção e dados de PDA usando catequina e epicatequina como padrões. Os resultados são apresentados na Tabela 8 e na Figura 9. Tal como mostrado na Tabela 6, o extrato de flavano gerado da extração de solvente com 80% de metanol:água forneceu a melhor concentração de componentes de flavano.

Tabela 8. Solventes para Gerar Extratos de Flavano Padronizados de

Acacia catechu

Solvente de Extração	Peso do Extrato	% Extraíveis de Biomassa	Quantidade total de Catequinas	% de Catequinas no Extrato
100% de água	292,8 mg	58,56%	13 mg	12,2%
(80:20) água:metanol	282,9 mg	56,58%	13 mg	11,19%
(60:40) água:metanol	287,6 mg	57,52%	15 mg	13,54%
(40:60) água:metanol	264,8 mg	52,96%	19 mg	13,70%
(20:80) água:metanol	222,8 mg	44,56%	15 mg	14,83%
100% de metanol	215,0 mg	43,00%	15 mg	12,73%
(80:20) metanol:THF	264,4 mg	52,88%	11 mg	8,81%
(60:40) metanol:THF	259,9 mg	51,98%	15 mg	9,05%

Exemplo 13. Preparação de Extratos de Flavonóides de Anel-B-Livre Padronizados de diversas espécies de *Scutellaria*

[0183] *Scutellaria orthocalyx* (500 mg de raízes trituradas) foi extraída duas vezes com 25 mL dos seguintes sistemas de solvente. (1) 100% de água, (2) 80:20 água:metanol, (3) 60:40 água:metanol, (4) 40:60 água: metanol, (5) 20:80 água:metanol, (6) 100% de metanol, (7) 80:20 metanol: THF, (8) 60:40 metanol:THF. Os extratos foram combinados, concentrados e secados sob vácuo baixo. A identificação dos componentes químicos em cada extrato foi realizada por HPLC usando um detector PhotoDiode Array (HPLC/PDA) e uma coluna C18 de 250 mm x 4,6 mm. Os componentes químicos foram quantificados com base no tempo de retenção e dados de PDA usando baicaleína, baicalina, scutellareína e wogonina como padrões. Os resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Quantificação de Flavonóides de Anel-B-Livre, Extraídos de *Scutellaria orthocalyx*

Solvente de Extração	Peso do Extrato	% Extraíveis de Biomassa	Quantidade total de Flavonóides	% de Flavonóides no Extrato
100% de água	96 mg	19,2%	0,02 mg	0,20%

Solvente de Extração	Peso do Extrato	% Extraíveis de Biomassa	Quantidade total de Flavonóides	% de Flavonóides no Extrato
(80:20) água:metanol	138,3 mg	27,7%	0,38 mg	0,38%
(60:40) água:metanol	169,5 mg	33,9%	0,78 mg	8,39%
(40:60) água:metanol	142,2 mg	28,4%	1,14 mg	11,26%
(20:80) água:metanol	104,5 mg	20,9%	0,94 mg	7,99%
100% de metanol	57,5 mg	11,5%	0,99 mg	10,42%
(80:20) metanol:THF	59,6 mg	11,9%	0,89 mg	8,76%
(60:40) metanol:THF	58,8 mg	11,8%	1,10 mg	10,71%

[0184] *Scutellaria baicalensis* (1000 mg de raízes trituradas) foi extraída duas vezes usando 50 mL de uma mistura de metanol e água tal como se segue: (1) 100% de água, (2) 70:30 água:metanol, (3) 50:50 água:metanol, (4) 30:70 água:metanol, (5) 100% de metanol. Os extratos foram combinados, concentrados e secados sob vácuo baixo. A identificação dos componentes químicos em cada extrato foi realizada por HPLC usando um detector PhotoDiode Array (HPLC/PDA) e uma coluna C18 de 250 mm x 4,6 mm. Os componentes químicos foram quantificados com base no tempo de retenção e dados de PDA usando baicaleína, baicalina, scutellareína e wogonina como padrões. Os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Quantificação de Flavonóides de Anel-B-Livre, Extraídos de *Scutellaria baicalensis*

Solvente de Extração	Peso do Extrato	% Extraíveis de Biomassa	Quantidade total de Flavonóides	% de Flavonóides no Extrato
100% de água	277,5 mg	27,8%	1 mg	0,09%
(70:30) água:metanol	338,6 mg	33,9%	1,19 mg	11,48%
(50:50) água:metanol	304,3 mg	30,4%	1,99 mg	18,93%
(30:70) água:metanol	293,9 mg	29,4%	2,29 mg	19,61%
100% de metanol	204,2 mg	20,4%	2,73 mg	24,51%

Exemplo 14. Preparação de uma Formulação com um Extrato de Flavonóides de Anel-B-Livre Padronizado das Raízes de *Scutellaria Baicalensis* e um Extrato de Flavano Padronizado da Casca de *Acacia catechu*

[0185] Uma nova composição de material, referida no presente como Univestin®, foi formulada usando dois extratos padronizados, isolados de *Acacia* e *Scutellaria*, respectivamente, junto com um ou mais excipientes. Um exemplo geral para preparar uma composição desse tipo é apresentado abaixo. O extrato de *Acacia* usado nesse exemplo continha >60% de flavanos totais, como catequina e epicatequina, e o extrato de *Scutellaria* continha >70% de flavonóides de anel-B-Livre, que era, principalmente, baicalina. O extrato de *Scutellaria* continha outras quantidades menores de flavonóides de anel-B-Livre, tal como apresentado na Tabela 11. Um ou mais excipientes são adicionados à composição de material. A relação de flavano e flavonóides de anel-B-Livre pode ser ajustada com base nas indicações e nas necessidades específicas com relação à inibição de COX-2 vs. 5-LO e exigências de potência do produto. A quantidade dos excipientes pode ser ajustada com base no efetivo conteúdo ativo de cada ingrediente. Uma tabela de mistura para cada lote de produto individual precisa ser gerada com base na especificação de produto e resultados de QC para lotes individuais de ingredientes. Quantidades adicionais de ingredientes ativos, na faixa de 2-5%, são recomendadas, para satisfazer a especificação do produto. A Tabela 11 mostra uma tabela de mistura que foi gerada para um lote de Univestin® (lote#G1702-COX-2).

[0186] Extrato de raízes de *Scutellaria baicalensis* (38,5 kg) (lote #RM05302-01) com um conteúdo de flavonóides de anel-B-Livre de 82,2% (baicalina); extrato de casca de *Acacia catechu* (6,9 kg) (lote #RM052902-01), com conteúdo total de flavano de 80,4%; e excipiente (5,0 kg de Candex) foram combinados para obter uma formulação de

Univestin® (50,4 kg), com uma relação de mistura de 85:15. A Tabela 9 mostra a quantificação dos flavonóides de anel-B-Livre e flavanos ativos desse lote específico de Univestin® (Lote # G1702-COX-2), determinados usando os métodos descritos nos Exemplos 7 e 9.

Tabela 11. Conteúdo de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos da formulação de Univestin®

Componentes Ativos	% Conteúdo
1. Flavonóides	
a. Baicalina	62,5%
b. Flavonóides secundários	
i. wogonina-7-glucoronida	6,7%
ii. oroxilina A 7-glucoronida	2,0%
iii. baicaleína	1,5%
iv. wogonina	1,1%
v. crisina-7-glucoronida	0,8%
vi. 5-metil-wogonin-7-glucoronida	0,5%
vii. scutelarina	0,3%
viii. norwogonina	0,3%
ix. crisina	<0,2%
x. oroxilina A	<0,2%
c. Total de flavonóides de anel-B-livre	75,7%
2. Flavanos	
a. Catequina	9,9%
b. Epicatequina	0,4%
c. Subtotal de flavanos	10,3%
3. Total de Ingredientes Ativos	86%

[0187] Com referência à Tabela 9, esse lote específico de Univestin® contém um total de 86% de ingredientes ativos, incluindo 75,7% de flavonóides de anel-B-Livre e 10,3% de flavanos. Dois níveis de dosagem diferentes do produto final em forma de cápsula foram produzidos desse lote de Univestin® (50,0 kg): 125 mg por dose (60 cápsulas) e 250 mg por dose (60 cápsulas). O produto final foi avaliado em um ensaio clínico humano, tal como descrito no Exemplo 15.

[0188] Usando o mesmo método, dois outros lotes de Univestin® foram preparados usando uma combinação de um extrato de flavonói-

des de anel-B-Livre padronizado de raízes de *Scutellaria baicalensis* e um extrato de flavano padronizado de casca de *Acacia catechu*, com uma relação de mistura de 50:50 e 20:80, respectivamente.

Exemplo 15. Medições de Resposta à Dose e Valores de IC₅₀ de Inibições da Enzima COX por Três Formulações de Uninvestin®

[0189] As três formulações diferentes de Uninvestin® são produzidas tal como descrito no Exemplo 14 e foram testadas quanto à atividade inibitória de COX-1 e COX-2 tal como descrito no Exemplo 6. Todas as três formulações mostram uma resposta à dose significativa de inibição das atividades das enzimas COX, tal como demonstrado nas Figuras 11, 12 e 13.

Exemplo 16. Medições de Resposta à Dose e Valores de IC₅₀ de Inibição da Enzima LO por uma Formulação de Uninvestin®

[0190] Uma amostra de Uninvestin® foi produzida tal como descrito no Exemplo 14, usando uma combinação de um extrato padronizado de flavonóides de anel-B-Livre de raízes de *Scutellaria baicalensis* e um extrato padronizado de flavano de casca de *Acacia catechu*, com uma relação de mistura de 80:20. A amostra foi titulada em meio de cultura de tecido contendo células THP-1 ou HT-29, linhas de células monócitas, que expressam COX-1, COX-2 e 5-LO. Um teste ELISA competitivo para LTB₄ (LTB₄; Neogen, Inc., Cat#406110) foi usado para determinar o efeito de Uninvestin® sobre níveis recém-sintetizados de LTB₄ presentes em cada linha celular como uma medida do efeito inibitório de Uninvestin® sobre o caminho de 5-LO. O teste foi realizado em duplicata adicionando 160.000 a 180.000 células por cavidade em placas de 6 cavidades. Uninvestin® foi adicionado às culturas de THP-1 a 3, 10, 30 e 100 µg/mL e incubado durante a noite (~12-15 horas) a 37°C, com 5% de CO₂ em ambiente umidificado. Os resultados são apresentados na Figura 14, que mostra que a produção de LTB₄ recém induzido por LPS foi quase que completamente inibida pela adi-

ção de Univestin® às culturas de THP-1, entre 3 e 10 µg/mL.

[0191] Univestin® e ibuprofeno, outro inibidor de 5-LO conhecido, foram adicionados às células de HT-29 a 3 µg/mL e incubados por 48 horas a 37°C, com 5% de CO₂ em um ambiente umidificado. Cada linha celular tratada foi depois coletada por centrifugação e desintegrada por lise de homogeneização dounce suave em tampões fisiológicos. Tal como mostrado na Figura 15, Univestin® inibiu a geração de 80% do LTB₄ recém sintetizado em células HT-29. Ibuprofeno mostrou uma redução de apenas 20% na quantidade de LTB₄ no mesmo período de tempo.

Exemplo 17. Inibição Diferencial da Expressão de Genes de cox-2, mas não de cox-1, por Univestin® vs. outras NSAIDs

[0192] Para avaliar se Univestin® está operando no nível genômico, monócitos de sangue periférico humano, isolados (PBMCs) foram estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) tratado com Univestin®, tal como descrito no Exemplo 14, celecoxib, ibuprofeno ou acetaminofeno, e o RNA total produzido foi depois coletado e avaliado por TA-qPCR semiquantitativo. Especificamente, o teste foi construído adicionando 130.000 células por cavidade em placas de 6 cavidades. As células foram depois estimuladas com 10 ng/ mL de LPS e coincubadas com Univestin®, a 1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL, e celecoxib, ibuprofeno e acetaminofeno, a 3 µg/mL, por 18 horas a 37°C, com 5% de CO₂ em um ambiente umidificado. Cada condição de tratamento de células foi depois coletado por centrifugação e o RNA total produzido foi isolado usando o reagente TRIzol® (Invitrogen® Life Technologies, Cat# 15596-026) e o protocolo de reagente TRIzol® recomendado. O RNA total foi transcrito inversamente usando transcriptase inversa de Vírus de Leucemia Murina Moloney (M-MLV TA; Promega Corp., Cat#M1701) usando hexâmeros aleatórios (Promega Corp., Cat#C1181). Testes de qPCR foram realizados em um Sistema de De-

tecção de Seqüências ABI Prism®7700, usando produtos Assays-on-Demand pré-desenvolvidos, validados (AOD de Applied Biosystems, Inc., Cat#4331182) para padrão interno de 18S rRNA e testes específicos de genes. Valores de expressão específicos de genes foram padronizados para seus respectivos valores de expressão de genes de 18S rRNA (controle interno) e depois a condição de tratamento sem LPS, sem droga, normalizada para 100. As condições de tratamento são relativas a essa condição zero.

[0193] Univestin® diminui a expressão de genes normalizada de cox-2 em mais de 100 vezes, enquanto a expressão de genes normalizada de cox-1 mostrou pouca variação. Quando PBMCs foram tratados com 3 µg/mL de Univestin®, celecoxib, ibuprofeno ou acetaminofeno, apenas Univestin® não aumentou a expressão de genes de cox-2. Acredita-se que esse seja o primeiro relatório de mudanças nos níveis de expressão de genes de eicosinóides, citocinas, quimioquinas e outros genes implicados em caminhos de dor e inflamação, após tratamento com uma mistura de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos usando técnicas de TA-qPCR semiquantitativas. Esse trabalho foi um trabalho associado a testes baseados em ELISA, para avaliar mudanças em níveis de proteína, bem como testes de função enzimática, para avaliar alterações na função de proteínas. Como resultados desses estudos, foram demonstrado efeitos conjuntos, tanto genômicos como proteômicos, após o tratamento com Univestin®. Outros estudos citados na literatura usaram métodos específicos de proteínas para inferir a expressão de genes, em vez que mostrá-la diretamente. Os resultados são apresentados nas Figuras 16 e 17.

Exemplo 18. Avaliação da Eficácia de Univestin® com um Modelo *in vivo* de Inchaço de Orelha de Camundongo

[0194] A fim de testar se Univestin® pode ser usado para tratar inflamação *in vivo*, a composição, preparada tal como descrito no

Exemplo 14, foi administrada por administração oral a camundongos ICR com 4-5 semanas de idade (Harlan Labs), um dia antes do tratamento de suas orelhas com AA. Os camundongos de teste receberam doses equivalentes a 50, 100 e 200 mg/kg de Uninvestin®, suspenso em óleo de oliva, enquanto os camundongos de controle receberam apenas óleo de oliva. No dia seguinte, 20 µl de 330 mM de AA em 95% de álcool foram aplicados a uma orelha de cada camundongo, enquanto álcool foi aplicado na outra orelha, como controle. Os camundongos tratados com Uninvestin® mostraram uma resposta à dose mensurável, que acompanhou as doses crescentes de Uninvestin®, tal como demonstrado na Figura 18. Com referência à Figura 18, a dose de 200 mg/kg reduz o inchaço em mais de 50% em comparação com o controle sem Uninvestin®. A dose de 50 mg/kg de Uninvestin® foi tão eficaz quanto a dose de 50 mg/kg de outro agente antiinflamatório forte, indometacina.

Exemplo 19. Avaliação da Eficácia de Uninvestin® com Modelo *in vivo* de Inchaço da Junta do Tornozelo de Camundongo

[0195] Como Uninvestin® está previsto para atingir dor nas juntas, uma solução de 20 µl de 100 mM de AA em 95% de etanol foi injetada nas juntas do tornozelo traseiro de camundongos ICR com 4-5 semanas de idade (Harlan Labs), para gerar um inchaço. O grupo de teste recebeu 100 mg/kg de Uninvestin® suspenso em óleo de oliva ~12 horas antes, enquanto o outro grupo não recebeu Uninvestin®. Os grupos de controle incluíram camundongos que não fornecer injeções de ácido araquidônico (controle negativo) e um grupo que teve injetado 95% de etanol sem AA (controle de veículo). Esses grupos também não receberam Uninvestin®. Os resultados são apresentados na Figura 19. Com referência à Figura 19, os camundongos que receberam Uninvestin® e foram injetados com AA mostram níveis de inchaço secundários se comparados com os cotnroles e o grupo injetado com ácido araqui-

dônico não-tratado. Esses resultados demonstram a eficácia de Uninvestin® para reduzir inchaço nas junta, o local da ação.

Exemplo 20. Avaliação Clínica da Eficácia de Flavonóides de anel-B-Livre e Flavanos no Alívio da Dor Causada por Artrite Reumatóide ou Osteoartrite do Joelho e/ou Quadril

[0196] Esse estudo clínico foi um estudo de centro único, randomizado, duplo cego, controlado por placebo. Sessenta pacientes (n=60) com artrite reumatóide ou osteoartrite do joelho e/ou quadril foram colocados aleatoriamente em um dos seguintes quatro grupos:

A ₀	Placebo	n-15	Placebo	
A ₁	Dose 1	n-15	Uninvestin™	250 mg/dia (125 mg b.i.d.)
A ₂	Dose 2	n-15	Uninvestin™	500 mg/dia (250 mg b.i.d.)
A ₃	Controle Ativo	n-15	Celecoxib	200 mg/dia (100 mg b.i.d.)

[0197] O Uninvestin® foi preparado tal como descrito no Exemplo 14. Esse lote específico de Uninvestin® (lote#G1702-COX-2) contém 86% de ingredientes ativos totais, incluindo 75,7% de flavonóides de anel-B-Livre e 10,3% de flavanos. Celecoxib, também conhecido por Celebrex®, é um nome comercial para uma droga de prescrição que é um inibidor seletivo para COX-2. Os pacientes foram agrupados por sexo e escolhidos de idades entre 40 e 75 anos. O tratamento consistiu na administração oral por 90 dias do placebo ou do composto ativo (Uninvestin® ou celecoxib) de acordo com o programa de dosagem acima. Os pacientes que estavam tomando NSAIDs passaram por um período de duas semanas de limpeza, antes de iniciar o estudo. A atividade física não foi limitada, nem os pacientes receberam quaisquer recomendações quanto a dieta. Os pacientes eram livres para retirar-se do teste a qualquer momento, por qualquer razão. A eficácia do tratamento foi avaliada a 30, 60 e 90 dias de administração oral por médicos, usando o Índice de Osteo-Artrite das Universidades

de Western Ontario e McMaster (WOMAC) (veja Lingard et al. (2001) J. Bone & Joint Surg. 83:1856-1864; Soderman and Malchau (2000) Acta Orthop.Scand. 71(1):39-46).Esse protocolo foi examinado e aprovado por um conselho de IRB da Universidade de Montreal.

[0198] O WOMAC foi administrado aos pacientes, preferivelmente, no consultório do médico. Foi-lhes solicitado que lessem e respondessem a um questionário por si mesmos ou por procuração na sala de espera do consultório médico ou eles foram entrevistados por pessoal do projeto pelo telefone e os dados foram transcritos no banco de dados do computador. Isso ofereceu um ambiente estável entre os pacientes e reduziu a possibilidade de respostas tendenciosas entre os pacientes, devido a ambientes domésticos diferentes. Diferenças entre grupos para todas as medições foram avaliadas com a Análise de Variação de Uma Via e a Diferença Menos Significativa de Tukey para comparações múltiplas. Todas as questões receberam um peso de 0 a 4, dependendo da gravidade da dor, rigidez ou função deficiente. Esses valores foram depois convertidos em percentuais normalizados para 100 e informados como notas de WOMAC. Valores mais altos são indicativos de deficiência maior. A Tabela 12 apresenta as notas do índice WOMAC médias para dor, rigidez e função para 250 mg e 500 mg ao dia de Univestin®, comparados com celecoxib a 200 mg ao dia e o placebo antes do tratamento (linha de base) e a 30, 60 e 90 dias após o tratamento. Quanto menor a nota, menos dor e rigidez e melhor função tem o paciente.

Tabela 12. Notas do índice WOMAC na linha de base e a 30, 60 e 90 dias

ÍNDICE WOMAC	Univestin® 250		Univestin® 500		Celecoxib 200		Placebo	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Dor - linha de base	54,33	19,9	60,33	23,34	55	22,28	49,33	15,1
Dor - 30 dias	41,33	19,22	36	22,93	50	23,09	41,67	15,55
Dor - 60 dias	40,71	16,62	40,77	19,77	30	16,46	57,31	16,66
Dor - 90 dias	41,79	16,36	27,69	21,57	31,67	16,42	50	14,43
Rigidez - linha de base	63,33	26,92	61,67	23,84	47,5	21,75	46,67	21,37
rigidez - 30 dias	41,67	16,14	44,17	21,06	39,42	18,29	59,17	20,85
Rigidez - 60 dias	37,5	18,99	39,42	19,66	37,5	29,76	46,15	24,68
Rigidez - 90 dias	39,29	20,72	28,85	21,28	29,17	25,19	49,04	18,01
Função - linha de base	58,41	22,74	62,92	17,68	49,38	10,33	52,82	8,29
Função - 30 dias	42,09	14,51	47,59	17,18	48,43	9,29	51,88	14,8
Função - 60 dias	41,47	7,75	41,59	7,34	41,23	9,12	49,64	7,16
Função - 90 dias	42,44	17,08	38,12	13,21	44,41	11,06	50,95	12,73

[0199] A Tabela 13 apresenta a mudança absoluta média em notas de WOMAC para dor, rigidez e função. As mesmas estão expressas como a diferença entre a linha de base e as notas dadas a 30, 60 e 90 dias. Quanto mais negativa a nota, maior a melhora.

Tabela 13. Mudança Absoluta Média em Notas WOMAC a 30, 60 e 90 Dias*

Mudança Absoluta	Univestin® 250		Univestin® 500		Celecoxib 200		Placebo	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Dor - 30 dias	-13	24,41	-24,33	18,7	-4,23	15,92	-7,67	26,98
Dor - 60 dias	-14,64	26,85	-17,31	35,27	-22,31	22,51	5	13,54
Dor - 90 dias	-13,57	22,91	-30,38	21,06	-16,67	21,36	-2,31	15,89
rigidez - 30 dias	-21,67	24,31	-17,5	18,18	-8,65	20,66	13,5	29,88
Rigidez - 60 dias	-28,57	27,05	-21,15	33,61	-9,62	29,82	-1,92	30,55
Rigidez - 90 dias	-26,9	27,67	-31,73	20,17	-13,54	37,48	-0,96	26,74
Função - 30 dias	-16,32	19,58	-15,33	18,28	-0,37	6,86	-0,94	14,05
Função - 60 dias	-18,11	24,36	-21,4	19,79	-6,97	13,66	-3,49	11,81
Função - 90 dias	-17,13	23,69	-24,87	23,25	-2,78	8,34	-2,18	11,27

* Esses dados contêm apenas pacientes que competaram o estudo.

[0200] É muito difícil atribuir um desvio padrão a uma média de grupo em um teste clínico, devido às grandes diferenças que aparecem nos dados. Em vez disso, são preferidos limites de confiança para a média, porque eles dão um limite inferior e superior para a média e quanto menor o intervalo, tanto mais precisa é a estimativa da média. Limites de confiança são expressos em termos de um coeficiente de confiança. Um intervalo de confiança de 95% é o intervalo mais comumente usado para descrever uma média nesse tipo de análise estatística. Isso não implica que há uma probabilidade de 95% de que o intervalo contém a verdadeira média. Em vez disso, o nível de confiança está associado ao método de calcular o intervalo. O coeficiente de confiança é simplesmente a proporção de amostras de um determinado tamanho que podem ser esperadas que contenham a verdadeira média. Isso é, para um intervalo de confiança de 95%, se muitas amostras forem coletadas e o intervalo de confiança for computado, a longo prazo aproximadamente 95% desses intervalos contêm a verdadeira média. Tendo isso em mente, o intervalo de confiança de 95% foi computado para as notas WOMAC para dor, rigidez e função a 30, 60- e 90 dias.

[0201] Notas brutas/não-padronizadas para as notas WOMAC baseadas em uma escala Likert de cinco pontos, com uma variação entre 1 e 5, foram escolhidas para representar os índices finais de dor, rigidez e função deficiente (Figuras 20-31). A padronização para uma escala entre 0 e 100 foi usada em outras seções para uniformidade (veja Tabelas 12 e 13) e para aumentar a apreciação das magnitudes das mudanças. Porém dado que todas as figuras estão baseadas nas mesmas escalas de 1 - 5 pontos, os dados brutos foram traçados, uma vez que os mesmos refletem com mais precisão os métodos pelos quais essas notas foram obtidas dos questionários dos pacientes. Em outras palavras, como foi dada aos pacientes uma escolha entre 1 e 5,

essas representações refletem melhor a resposta do paciente, em oposição à nota padronizada ou transformada de 0 - 100, que não reflete a percepção do paciente da possível extensão das respostas.

[0202] Existem tendências claras mostrando que para o índice de dor, Univestin® a 250 e 500 mg/dia reduziu a dor no período de tratamento de 90 dias, com base nas respostas dos pacientes. Celecoxib também reduz a dor no mesmo período de tempo, quando comparado com o placebo, que não reduz a dor. Porém, celecoxib não parece ser tão eficaz quanto Univestin® nas duas dosagens em reduzir a rigidez, uma vez que os intervalos de confiança coincidem fortemente com os do placebo. Finalmente, Univestin® em ambas as doses claramente melhorou a disfunção funcional, mas não o celecoxib, comparado com placebo. As representações gráficas contêm todos os pacientes, mesmo se os mesmos não completaram o estudo. Cada intervalo de confiança, no entanto, é válido baseado no número de pacientes que estavam presentes na ocasião em que os testes WOMAC foram feitos, de modo que as tendências continuam válidas. Esses dados estão traçados nas Figuras 20 a 31.

Exemplo 21. Avaliação Clínica da Eficácia de Flavonóides de anel-B-Livre e Flavanos sobre BMI e Perda de Peso devido a um Aumento da Função

[0203] Medições adicionais que foram feitas durante o teste clínico foram peso e altura. Todos os pacientes em todos os grupos (veja Exemplo 20) foram medidos em altura e peso, a 30 e 90 dias de tratamento. Não foram feitas quaisquer recomendações sobre dieta ou exercício aos pacientes, a fim de não tender os resultados em direção à redução de BMI e perda de peso. A Tabela 14 representa as alterações de peso e BMI ocorridas após o tratamento por 30 e 90 dias.

Tabela 14. Alterações em Peso Médio (kg) e BMI (kg/m²) a 30 e 90 Dias

	Grupo							
	Univestin® 250		Univestin® 500		Celecoxib 200		Placebo	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Peso - 30 dias	-3,60	3,76	-2,40	3,31	-2,00	3,08	-,60	1,99
Peso - 90 dias	-5,36	3,43	-4,15	4,81	-3,17	4,88	-,08	1,50
BMI - 30 dias	-1,28	1,33	-,80	1,13	-,68	1,06	-,20	,64
BMI - 90 dias	-1,84	1,14	-1,39	1,64	-1,07	1,67	-,02	,54

[0204] Com base nesses dados, a dose de 250 mg/dia de Uninvestin® deu a maior quantidade de perda de peso e alteração em BMI, seguida da dose de 500 mg/dia de Uninvestin® e depois celecoxib. O placebo não teve efeito sobre o peso nem sobre o BMI.

[0205] Acredita-se que não haja outros informes na literatura sobre compostos antiinflamatórios sendo usados para causar perda de peso ou alterações de BMI. Embora os pacientes não tenham recebido recomendações sobre exercícios, as capacidades funcionais maiores obtidas pós o tratamento, especialmente com Uninvestin®, permitiram que eles se exercitassem mais por sua própria iniciativa. Alternativamente, Uninvestin® pode aumentar a termogênese, lipólise ou provocar uma subutilização de carboidratos ou gordura na dieta. As Figuras 32 e 33 representam a perda de BMI e peso vista para Uninvestin® após 30 e 90 dias de tratamento.

Exemplo 22. Avaliação clínica da Eficácia de Flavonóides de anel-B-Livre e Flavanos para Baixar a Glicose do Sangue devido a um Aumento na Função

[0206] A glicose do sangue também foi medida a 0 (linha de base), 30 dias e 90 dias após o tratamento (veja Exemplo 20). Essas medições foram informadas em mmole por litro. Os dados também são mostrados em mg/dl. A Tabela 15 apresenta níveis de glicose do sangue após 30 e 90 dias de tratamento com Uninvestin® a 250 e 500 mg/dia.

Tabela 15. Alteração na Glicose do Sangue após 30 e 90 dias de Tratamento

Grupo									
	Univestin® 250			Univestin® 500			Placebo		
	mmol/L	mg/dL	Desvio Padrão	mmol/L	mg/dL	Desvio Padrão	mmol/L	mg/dL	Desvio Padrão
Glicose - linha de base	5,24	94,32	,74	5,09	91,62	,67	4,82	86,76	,80
Glicose - 30 dias	5,10	91,80	,71	4,75	85,50	,55	5,08	91,44	,54
Glicose - 90 dias	4,88	87,84	,72	4,03	78,12	,36	4,71	84,78	,56
Alteração percentual aos 90 dias	-7,52			-12,79			,94		

[0207] Esses dados sugerem que tanto as doses de 250 como as de 500 mg/dia de Univestin® baixam significativamente os níveis de glicose do sangue ao longo do tempo. Esse impacto pode ou não estar associado à perda de peso observada acima ou ao presumível aumento de atividade, à medida que melhora a deficiência funcional. Também pode ser possível que Univestin® aja diretamente para melhorar o metabolismo de glicose por redução da tolerância à glicose ou utilizando os carboidratos mais eficazmente.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma mistura de baicalina e catequina, em que a baicalina é isolada de uma planta ou plantas do gênero de plantas *Scutellaria* e a catequina é isolada de uma planta ou plantas do gênero de plantas *Acacia*.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a proporção de baicalina:catequina na composição é de cerca de 85:15.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a baicalina e a catequina são isoladas de uma parte da planta selecionada a partir do grupo que consiste em caules, cascas do caule, troncos, cascas do tronco, galhos, tubérculos, raízes, cascas de raiz, brotos jovens, sementes, rizomas, flores e outros órgãos reprodutivos, folhas e outras partes aéreas.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que a catequina é isolada de uma espécie de planta selecionada a partir do grupo que consiste na *Acacia catechu*, *Acacia concinna*, *Acacia farnesiana*, *Acacia Senegal*, *Acacia speciosa*, *Acacia arabica*, *A. caesia*, *A. pennata*, *A. sinuata*, *A. mearnsii*, *A. picnantha*, *A. dealbata*, *A. auriculiformis*, *A. holosericea* e *A. mangium*.

5. Uso da composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para

(i) aliviar a dor e rigidez nas articulações e melhorar a mobilidade e a função física;

(ii) prevenir e tratar a osteoartrite e a artrite reumatóide;

(iii) reduzir as concentrações de glicose no sangue devido ao aumento da atividade física resultante da melhoria da mobilidade, flexibilidade e função física de um indivíduo; ou

(iv) diminuir o índice de massa corporal e causar perda de

peso.

6. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que é para uso em

(i) aliviar a dor e rigidez nas articulações e melhorar a mobilidade e a função física;

(ii) prevenir e tratar a osteoartrite e a artrite reumatóide;

(iii) reduzir as concentrações de glicose no sangue devido ao aumento da atividade física resultante da melhoria da mobilidade, flexibilidade e função física de um indivíduo; ou

(iv) diminuir o índice de massa corporal e causar perda de peso.

7. Uso da composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para prevenir e tratar as doenças mediadas pelas vias COX-2 e 5-LO e condições selecionadas a partir do grupo que consiste em cólicas menstruais, arteriosclerose, ataque cardíaco, obesidade, diabetes, síndrome X, doença de Alzheimer, reação alérgica respiratória, insuficiência venosa crônica, hemorroidas, lúpus eritematoso sistêmico, psoríase, cefaléia tensional crônica, enxaqueca, doença inflamatória intestinal; infecções tópicas causadas por vírus, bactérias, fungos, queimaduras solares, queimaduras térmicas, dermatite de contato, melanoma e carcinoma.

8. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que é para uso na prevenção e tratamento de doenças e condições mediadas pelas vias COX-2 e 5-LO selecionadas a partir do grupo que consiste em cólicas menstruais, arteriosclerose, ataque cardíaco, obesidade, diabetes, síndrome X, Doença de Alzheimer, reação alérgica respiratória, insuficiência venosa crônica, hemorroidas, Lúpus Eritromatose Sistêmico, psoríase, cefaléia tensional crônica, enxaqueca, doença inflamatória intestinal; in-

fecções tópicas causadas por vírus, bactérias, fungos, queimaduras solares, queimaduras térmicas, dermatite de contato, melanoma e carcinoma.

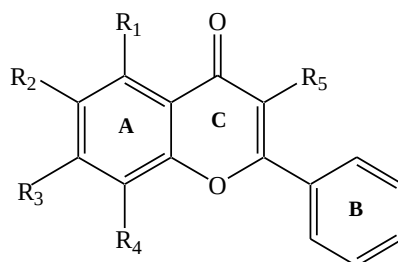
9. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizado pelo fato de que um extrato de uma planta contendo baicalina e um extrato de uma planta contendo catequina é misturado para formar uma mistura que é adicionada a um ou mais de um adjuvante, excipiente ou veículo para formar a composição.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o adjuvante, excipiente ou veículo é selecionado a partir do grupo que consiste em sais à base de cálcio, sílica, boro, histidina, sulfatos de glucosamina, sulfatos de condroitina, gluconato de cobre, celulose, vitamina D, vitamina K, cartilagem bovina e de tubarão.

11. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 10, caracterizado pelo fato de que a composição deve ser administrada em uma dosagem selecionada dentre 0,01 a 200 mg/kg de peso corporal.

12. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 11, caracterizado pelo fato de que as vias de administração são selecionadas a partir do grupo que consiste em administração oral, tópica, supositório, intravenosa e intradérmica, intragaster, intramuscular, intraperitoneal e intravenosa.

13. Uso de uma composição compreendendo uma mistura de flavonóides de anel B-livre e flavanos, sendo que os flavonóides de anel B-Livre apresentam a seguinte estrutura:



na qual

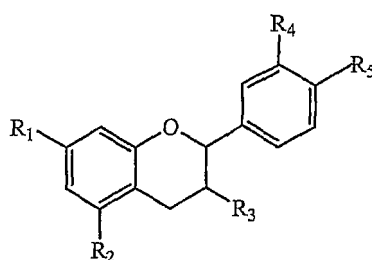
R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são escolhidos, independentemente, a partir do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, OR, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, ceto-hexose e os derivados químicos dos mesmos;

sendo que

R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

X é escolhido a partir do grupo de contra-ânions farmacêuticamente aceitáveis, incluindo, hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato,

e em que o flavano apresenta a seguinte estrutura:



na qual

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, -OCH₃, -SCH₃, -OR, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, ésteres de grupos de substituição, escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em ésteres de galato, acetato, cinamoíla e hidroxila-cinamoíla, ésteres de triidroxibenzoíla e ésteres de cafeoíla; um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, ceto-hexose e os derivados químicos dos mesmos; dímeros, trímeros e outros flavanos polimerizados;

sendo que

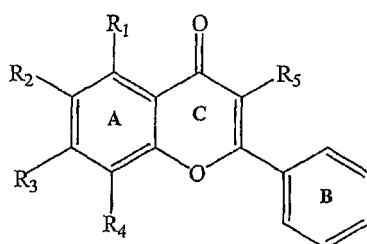
R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

X é escolhido do grupo de contra-ânions farmacêuticamen-

te aceitáveis, incluindo, mas não-limitados a hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato,

caracterizado pelo fato de que o referido uso é para a preparação de uma composição farmacêutica para aliviar a dor e rigidez nas articulações e melhorar a mobilidade e a função física.

14. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma mistura de flavonóides de anel-B-Livre e flavanos, sendo que os flavonóides de anel-B-Livre apresentam a seguinte estrutura:



na qual

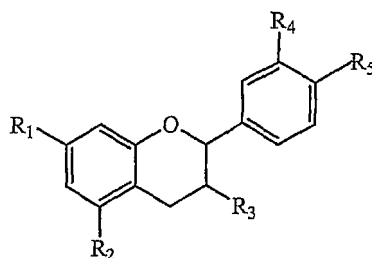
R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ são escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, OR, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, ceto-hexose e os derivados químicos dos mesmos;

sendo que

R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

X é escolhido do grupo de contra-ânions farmacêuticamente aceitáveis, incluindo, hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato,

e sendo que o flavano apresenta a seguinte estrutura:



na qual

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, -OCH₃, -SCH₃, -OR, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, ésteres de grupos de substituição, escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em ésteres de galato, acetato, cinamoíla e hidroxila-cinamoíla, ésteres de triidroxibenzoíla e ésteres de cafeoíla; um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, cetohexose e os derivados químicos dos mesmos; dímeros, trímeros e outros flavanos polimerizados;

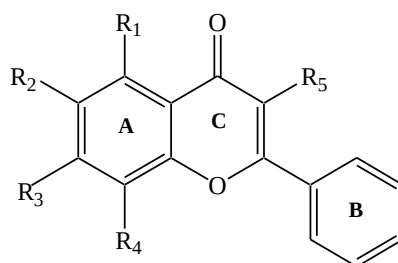
sendo que

R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

X é escolhido do grupo de contra-ânions farmacologicamente aceitáveis, incluindo, mas não-limitados a hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato,

em que a composição é para uso no alívio de dores e rigidez nas articulações e na melhora da mobilidade e da função física.

15. Uso de uma composição compreendendo uma mistura de pelo menos um flavonóide de anel B-livre e pelo menos um flavano, sendo que o flavonóide de anel B-Livre apresenta a seguinte estrutura:



na qual

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são escolhidos, independentemente, a partir do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, OR, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares,

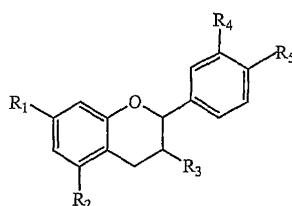
incluindo, aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, ceto-hexose e os derivados químicos dos mesmos;

sendo que

R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

X é escolhido a partir do grupo de contra-ânions farmacologicamente aceitáveis, incluindo, hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato,

e sendo que o flavano apresenta a seguinte estrutura:



na qual

R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ são escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, -OCH₃, -SCH₃, -OR, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, ésteres de grupos de substituição, escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em ésteres de galato, acetato, cinamoíla e hidroxila-cinamoíla, ésteres de triidroxibenzoíla e ésteres de cafeoíla; um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, ceto-hexose e os derivados químicos dos mesmos; dímeros, trímeros e outros flavanos polimerizados;

sendo que

R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

X é escolhido do grupo de contra-ânions farmacologicamente aceitáveis, incluindo, mas não-limitados a hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato

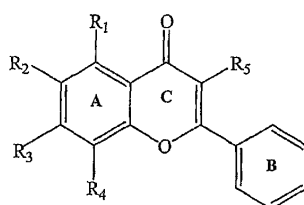
caracterizado pelo fato de que o referido uso é para a preparação de uma composição farmacêutica para

(i) prevenir e tratar a osteoartrite e a artrite reumatóide;

(ii) reduzir as concentrações de glicose no sangue devido ao aumento da atividade física resultante da melhoria da mobilidade, flexibilidade e função física de um indivíduo; ou

(iii) diminuir o índice de massa corporal e causar perda de peso.

16. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma mistura de pelo menos um flavonóide de anel-B-Livre e pelo menos um flavano, sendo que o flavonóide de anel-B-Livre apresenta a seguinte estrutura:



na qual

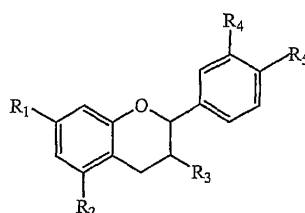
R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ são escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, OR, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, cetohexose e os derivados químicos dos mesmos;

sendo que

R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

X é escolhido do grupo de contra-ânions farmaceuticamente aceitáveis, incluindo, hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato,

e em que o flavano apresenta a seguinte estrutura:



na qual

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, -OCH₃, -SCH₃, -OR, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, ésteres de grupos de substituição, escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em ésteres de galato, acetato, cinamoíla e hidroxila-cinamoíla, ésteres de triidroxibenzoíla e ésteres de cafeoíla; um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, cetohexose e os derivados químicos dos mesmos; dímeros, trímeros e outros flavanos polimerizados;

sendo que

R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

X é escolhido do grupo de contra-ânions farmacologicamente aceitáveis, incluindo, mas não-limitados a hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato,

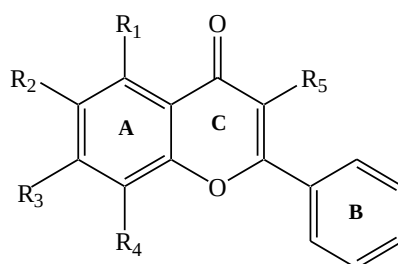
em que a composição é para uso para

(i) prevenir e tratar a osteoartrite e a artrite reumatóide;

(ii) reduzir as concentrações de glicose no sangue devido ao aumento da atividade física resultante da melhoria da mobilidade, flexibilidade e função física de um indivíduo; ou

(iii) diminuir o índice de massa corporal e causar perda de peso.

17. Uso de uma composição compreendendo uma mistura de pelo menos um flavonóide de anel B-livre e pelo menos um flavano, sendo que o flavonóide de anel B-Livre apresenta a seguinte estrutura:



na qual

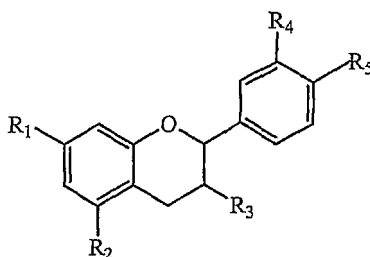
R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são escolhidos, independentemente, a partir do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, OR, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, ceto-hexose e os derivados químicos dos mesmos;

sendo que

R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

X é escolhido a partir do grupo de contra-ânions farmacêuticamente aceitáveis, incluindo, hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato,

e sendo que o flavano apresenta a seguinte estrutura:



na qual

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, -OCH₃, -SCH₃, -OR, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, ésteres de grupos de substituição, escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em ésteres de galato, acetato, cinamoíla e hidroxila-cinamoíla, ésteres de triidroxibenzoíla e ésteres de cafeoíla; um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, ceto-hexose e os derivados químicos dos mesmos; dímeros, trímeros e outros flavanos polimerizados;

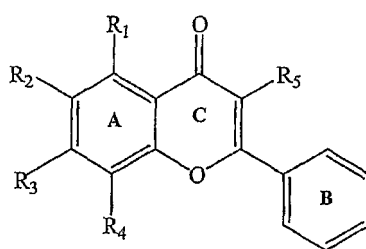
sendo que

R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

X é escolhido do grupo de contra-ânions farmacêuticamente aceitáveis, incluindo, mas não-limitados a hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato

caracterizado pelo fato de que o referido uso é para a preparação de uma composição farmacêutica para prevenção e tratamento de doenças mediadas pelas vias COX-2 e 5-LO e condições selecionadas a partir do grupo que consiste em cólicas menstruais, arteriosclerose, ataque cardíaco, obesidade, diabetes, síndrome X, doença de Alzheimer, reação alérgica respiratória, insuficiência venosa crônica, hemorróidas, Lúpus eritematose sistêmico, psoríase, cefaleia tensional crônica, enxaqueca, doença inflamatória intestinal; infecções tópicas causadas por vírus, bactérias, fungos, queimaduras solares, queimaduras térmicas, dermatite de contato, melanoma e carcinoma.

18. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma mistura de pelo menos um flavonóide de anel-B-Livre e pelo menos um flavano, sendo que o flavonóide de anel-B-Livre apresenta a seguinte estrutura:



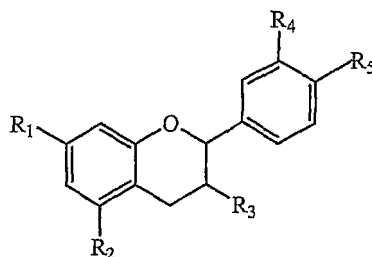
na qual

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, OR, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, ceto-hexose e os derivados químicos dos mesmos;

sendo que

R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

X é escolhido do grupo de contra-ânions farmacologicamente aceitáveis, incluindo, hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato, e sendo que o flavano apresenta a seguinte estrutura:



na qual

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 são escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em -H, -OH, -SH, -OCH₃, -SCH₃, -OR, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, ésteres de grupos de substituição, escolhidos, independentemente, do grupo que consiste em ésteres de galato, acetato, cinamoíla e hidroxila-cinamoíla, ésteres de triidroxibenzoíla e ésteres de cafeoíla; um glicosídeo de carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, de um único açúcar ou de uma combinação de múltiplos açúcares, incluindo, aldopentoses, metil-aldopentose, aldohexoses, cetohexose e os derivados químicos dos mesmos; dímeros, trímeros e outros flavanos polimerizados;

sendo que

R é um grupo alquila, com entre 1-10 átomos de carbono; e

X é escolhido do grupo de contra-ânions farmacologicamente aceitáveis, incluindo, mas não-limitados a hidroxila, cloreto, iodeto, sulfato, fosfato, acetato, fluoreto, carbonato,

em que a composição é para uso na prevenção e tratamento de doenças mediadas pelas vias COX-2 e 5-LO e condições selecionadas a partir do grupo que consiste em cólicas menstruais, arteriosclerose, ataque cardíaco, obesidade, diabetes, síndrome X, doença de Alzheimer, reação alérgica respiratória, insuficiência venosa crônica, hemorróidas, Lúpus eritematose sistêmico, psoríase, cefaleia tensional

crônica, enxaqueca, doença inflamatória intestinal; infecções tópicas causadas por vírus, bactérias, fungos, queimaduras solares, queimaduras térmicas, dermatite de contato, melanoma e carcinoma.

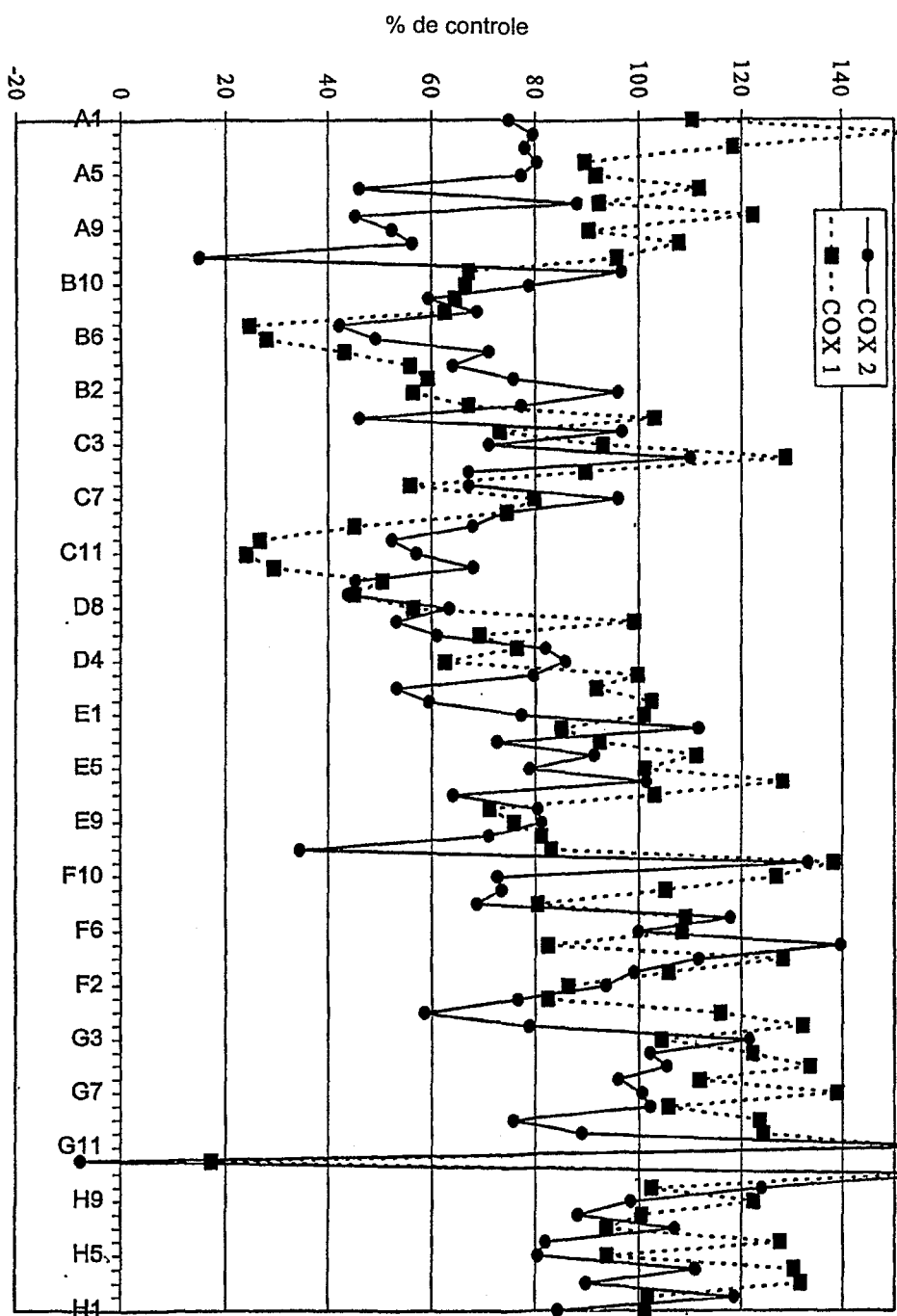


Fig. 1

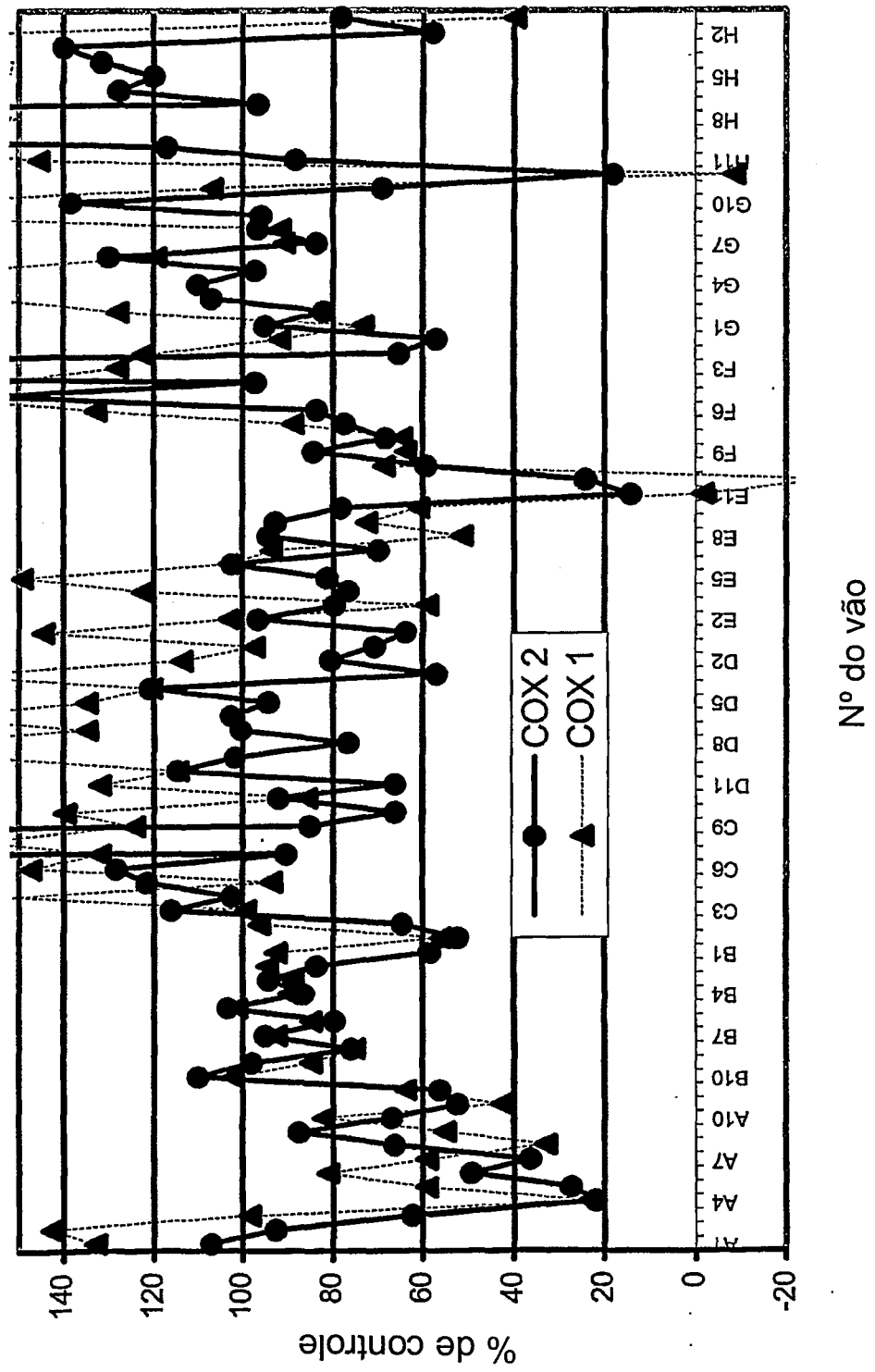


Fig. 2

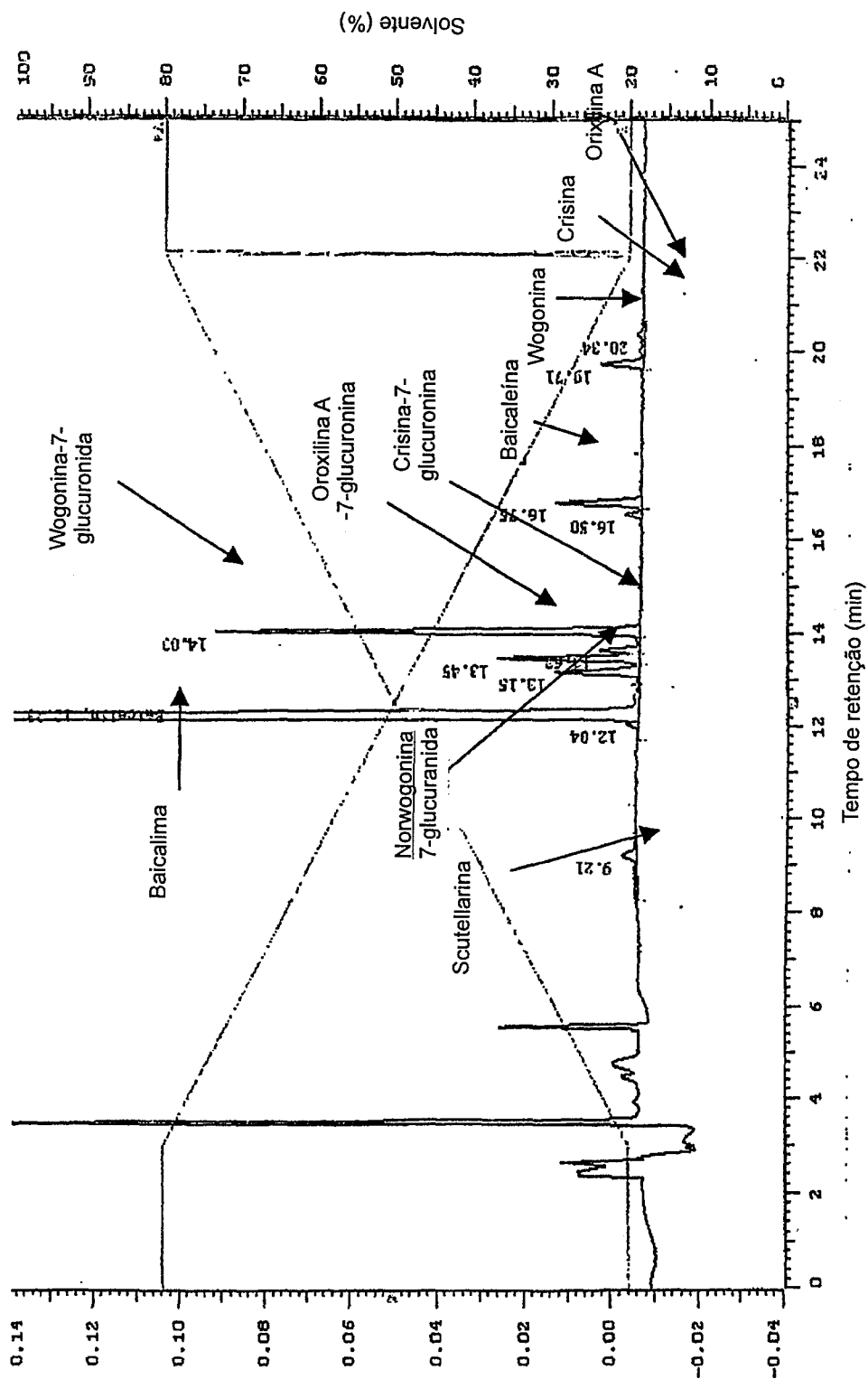


Fig. 3

4/20

Fig. 4

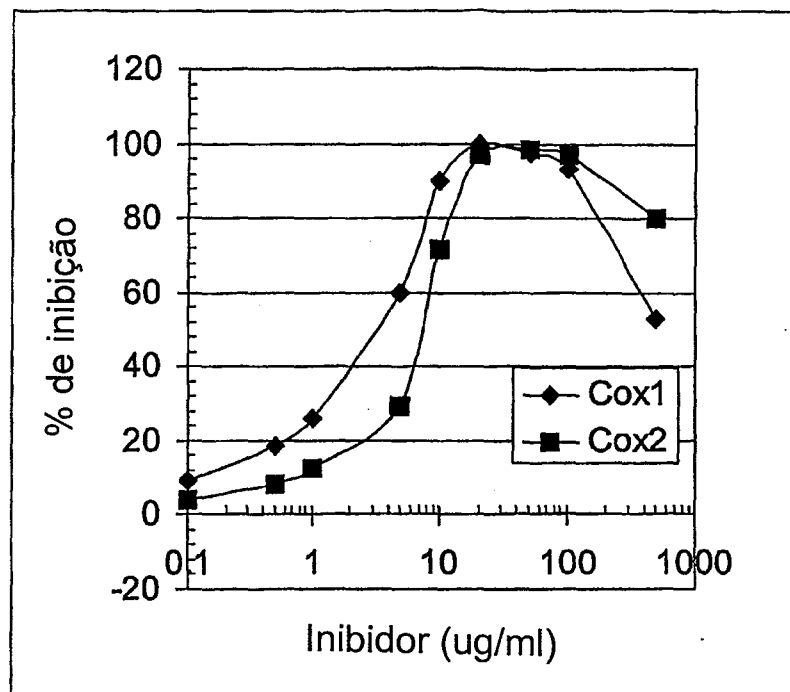
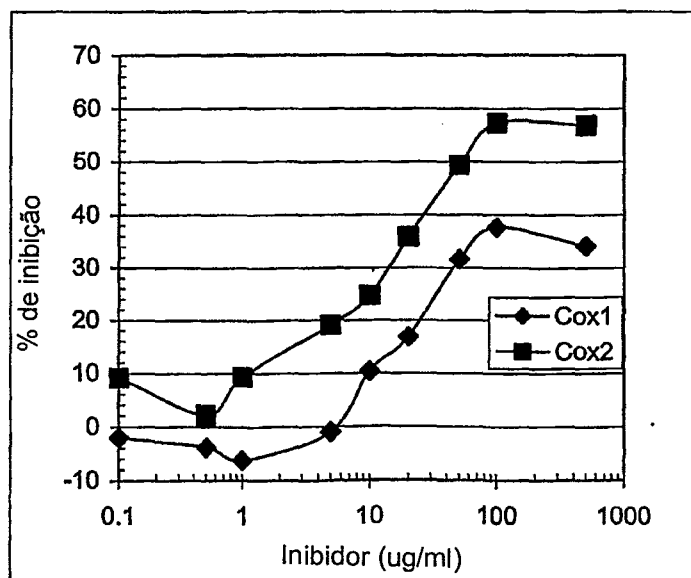


Fig. 5



5/20

Fig. 6

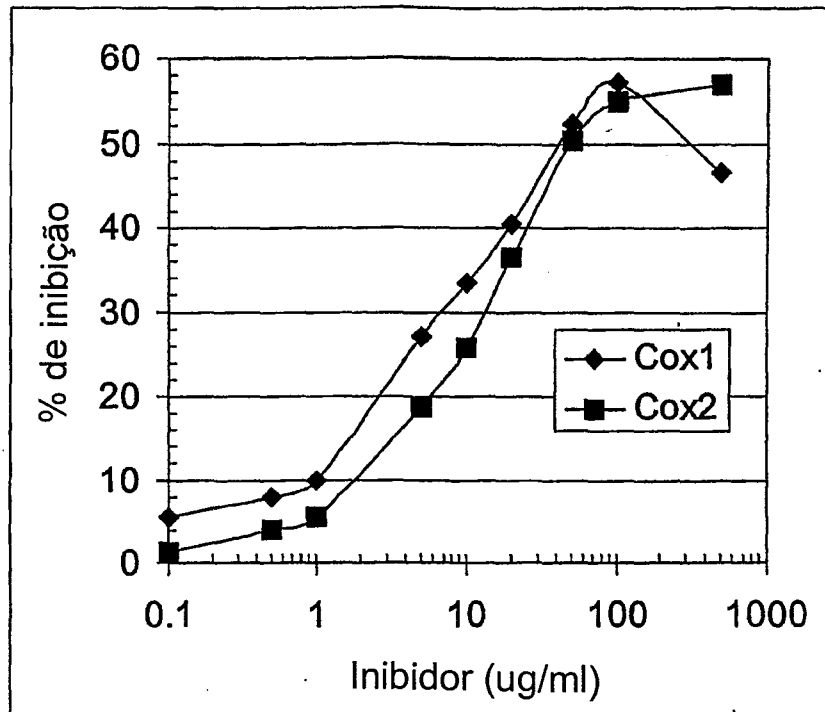
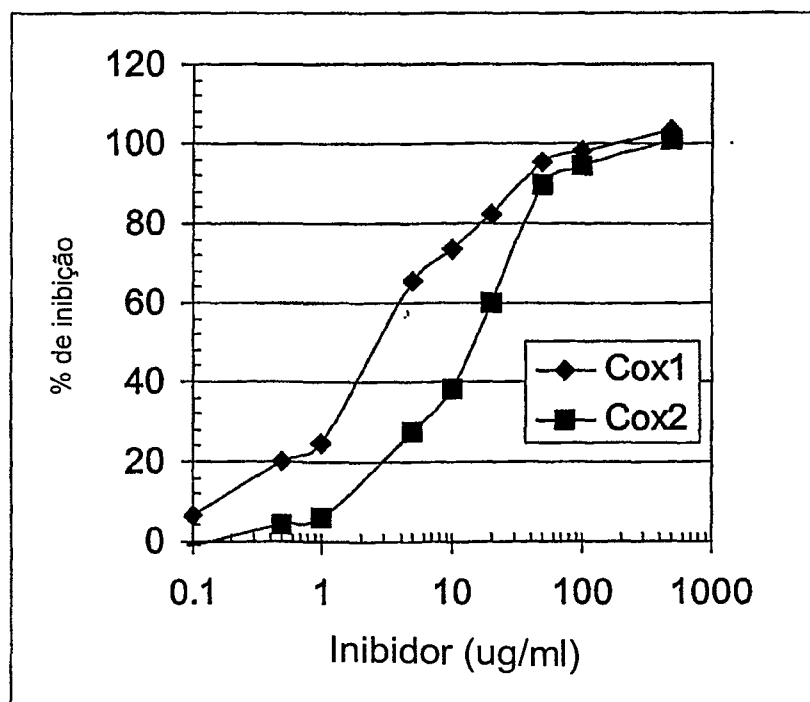
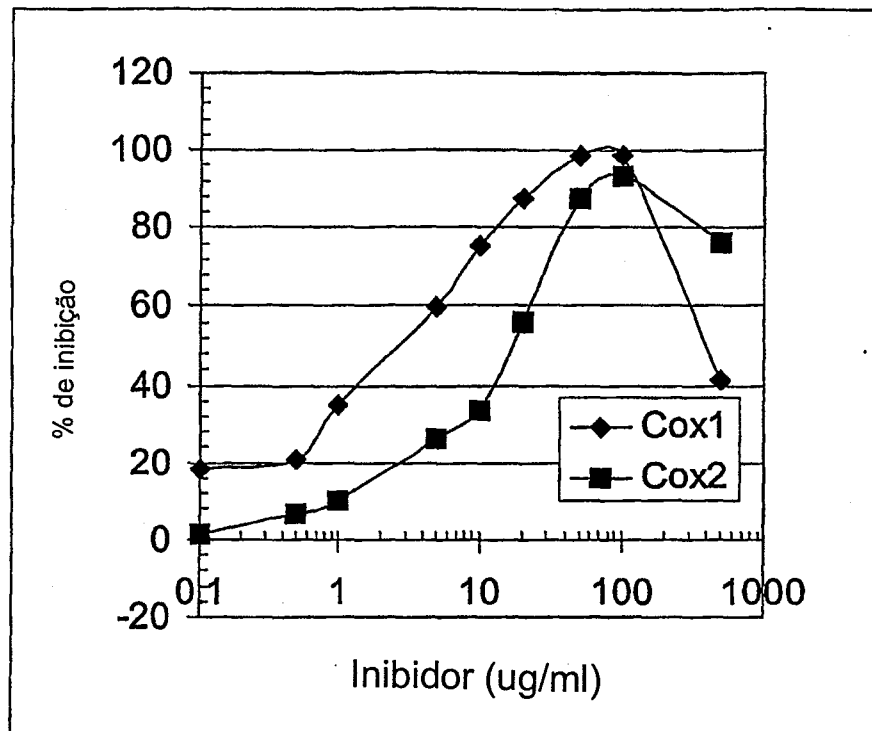


Fig. 7



6/20

Fig. 8



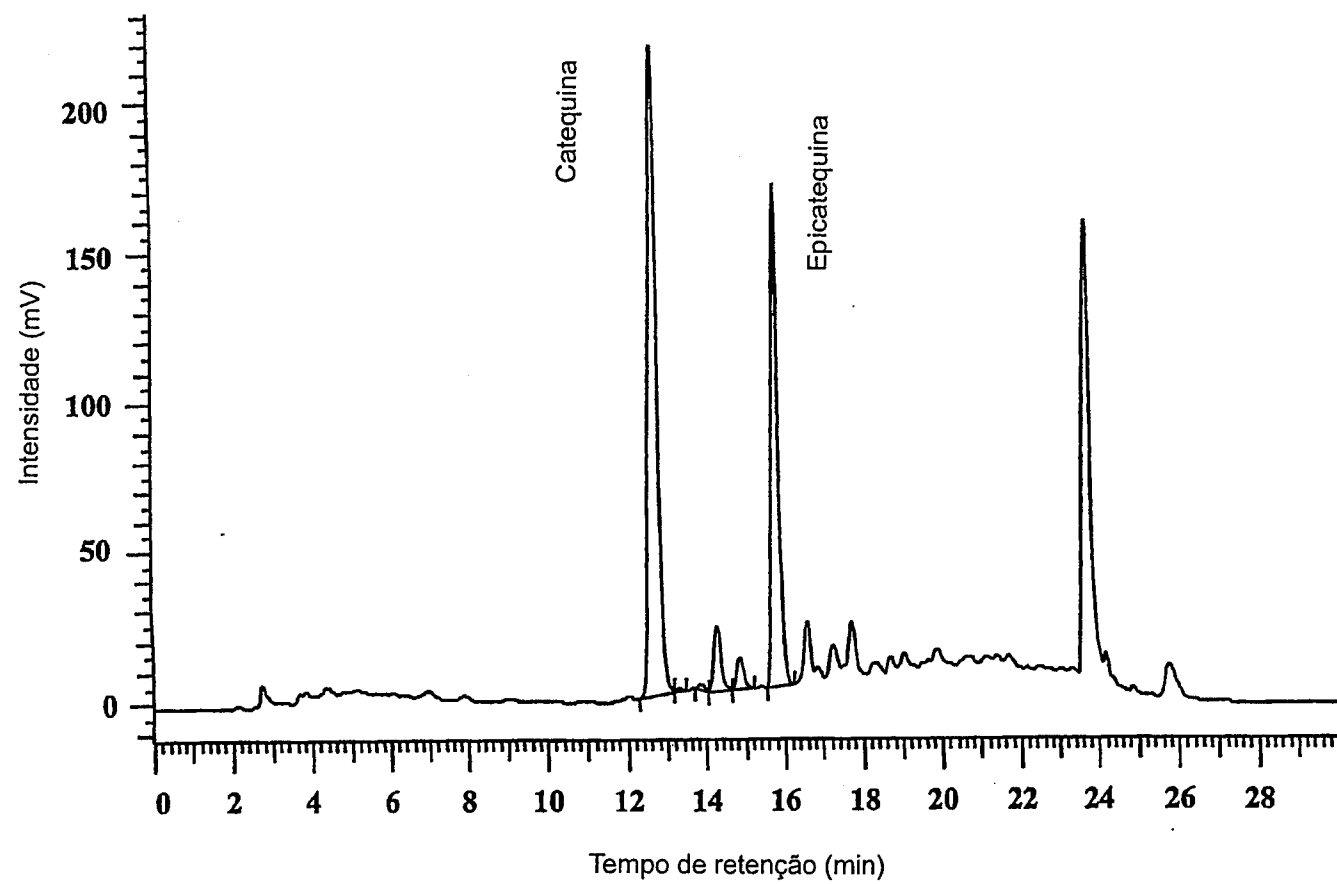


Fig. 9

Fig. 10

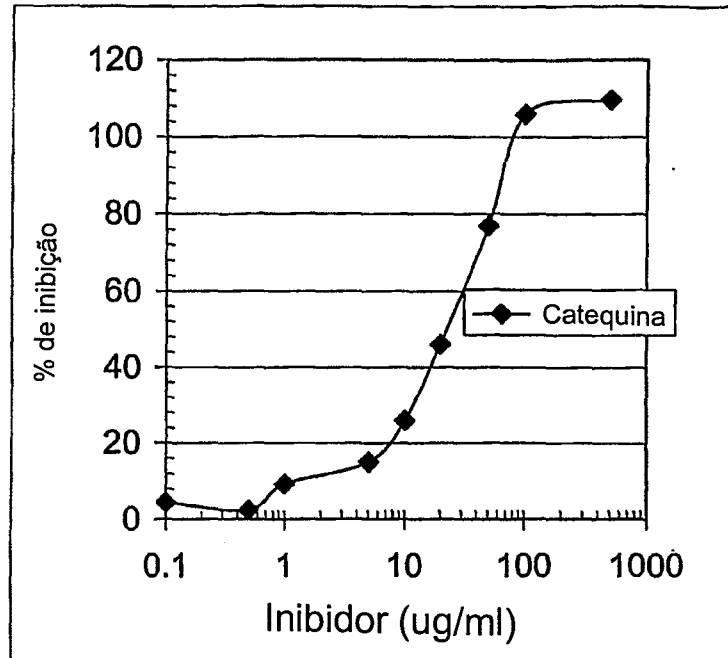
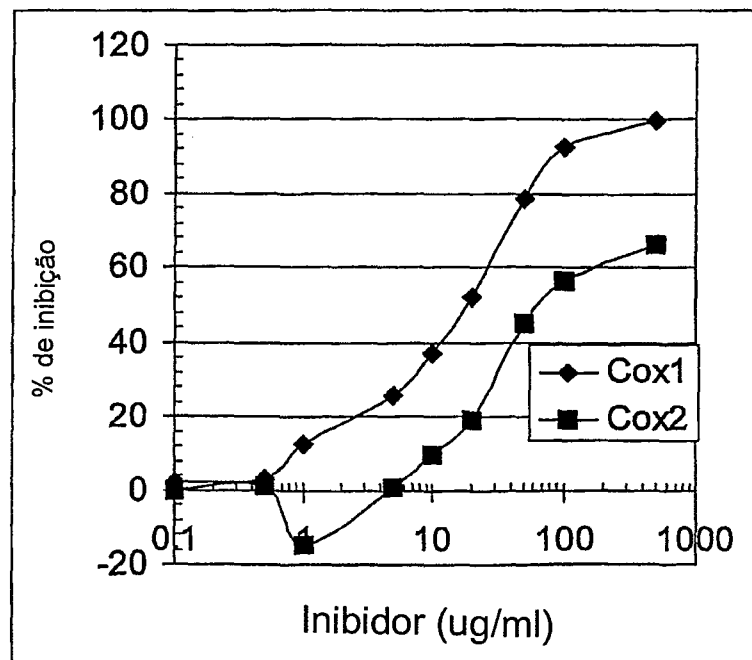


Fig. 11



9/20

Fig. 12

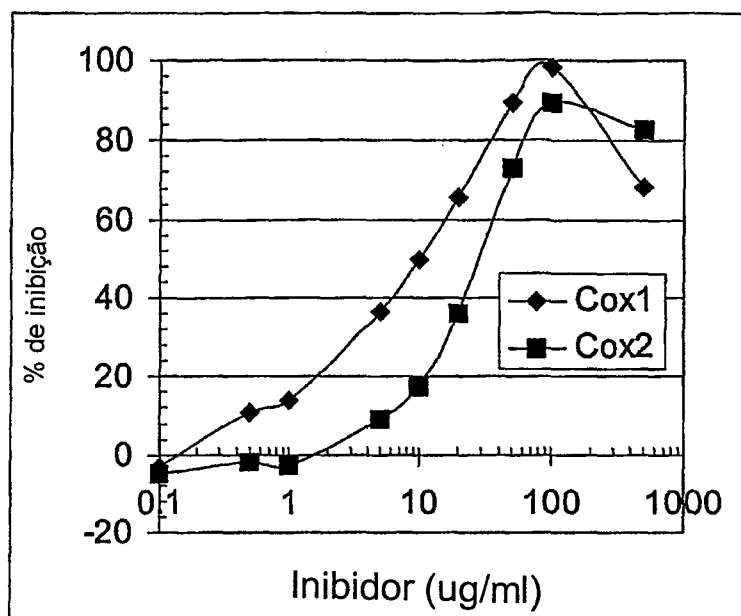
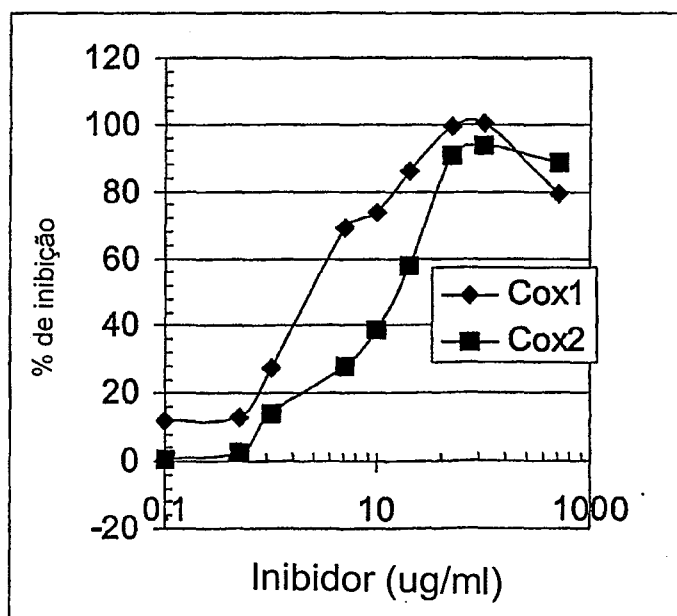


Fig. 13



10/20

Fig. 14

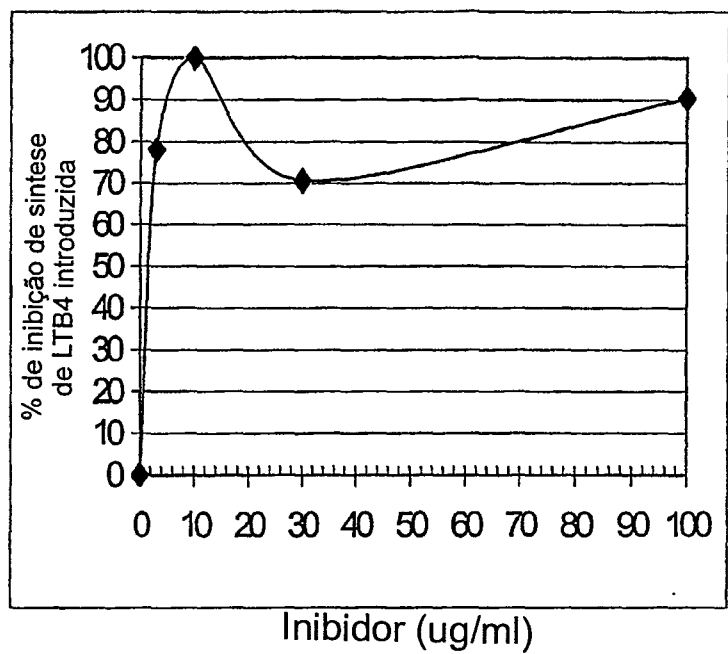


Fig. 15

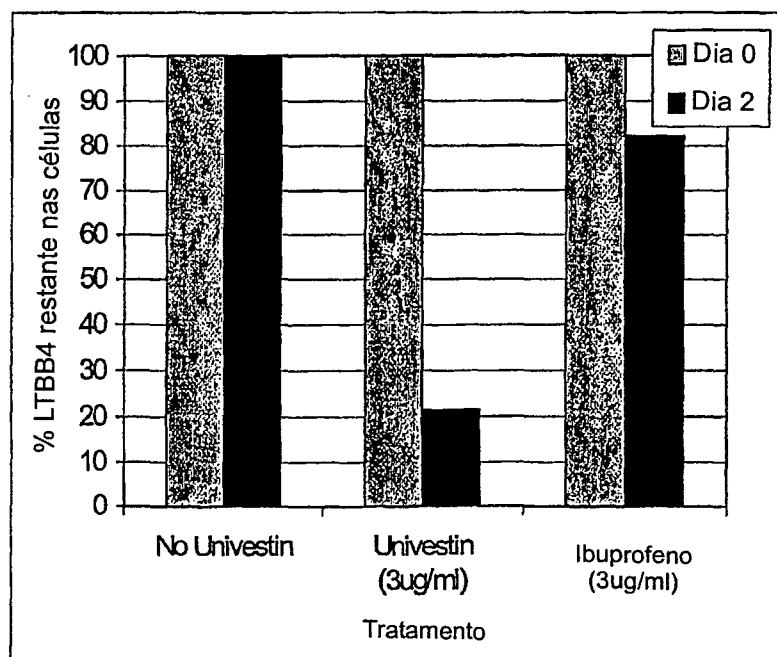


Fig. 16

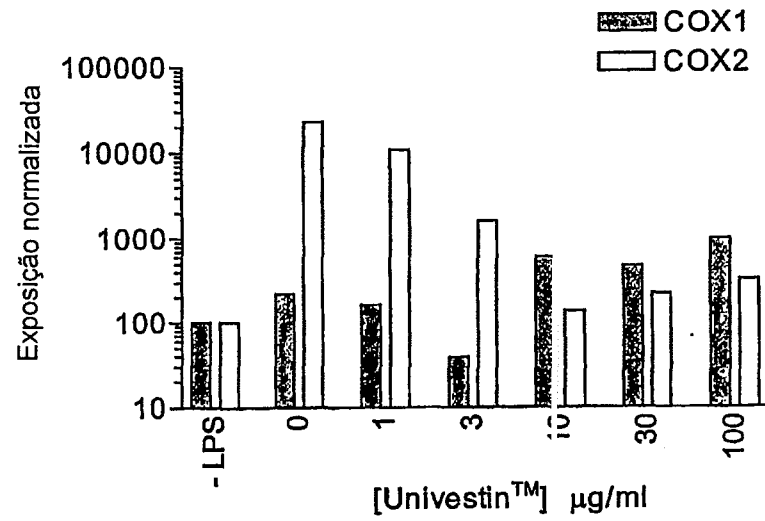
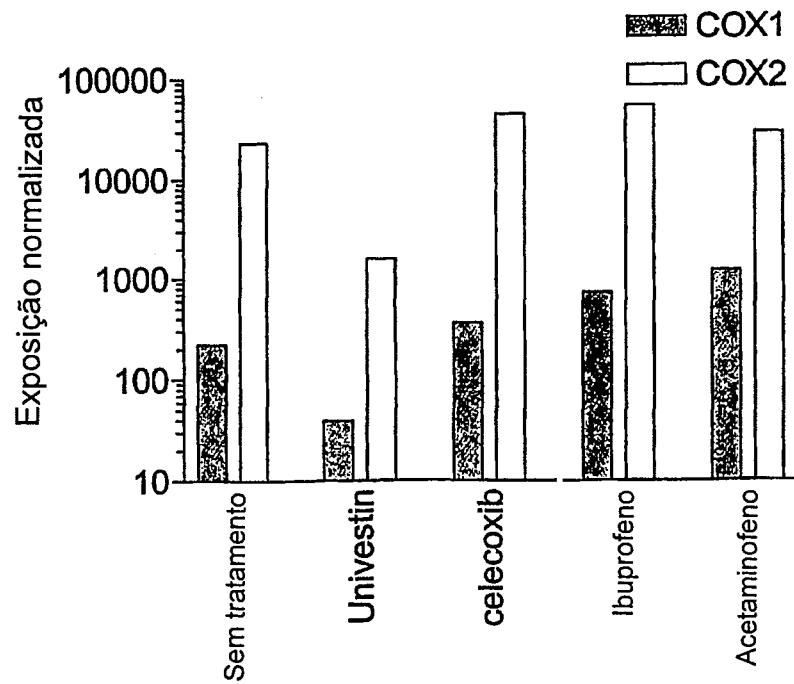


Fig. 17



12/20

Fig. 18

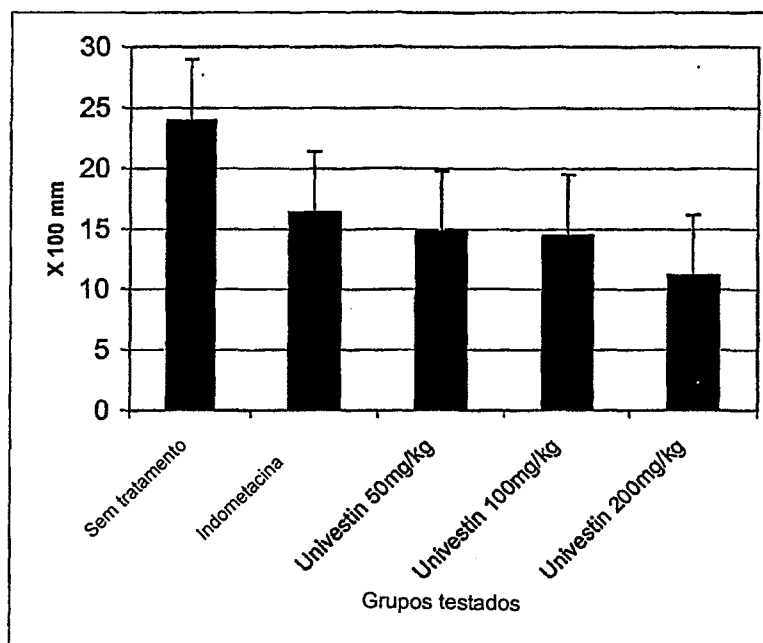


Fig. 19

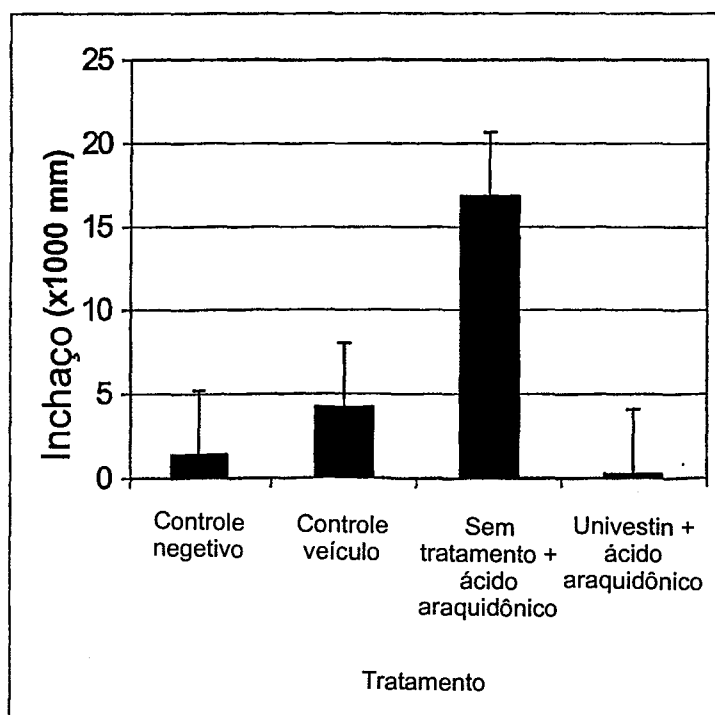


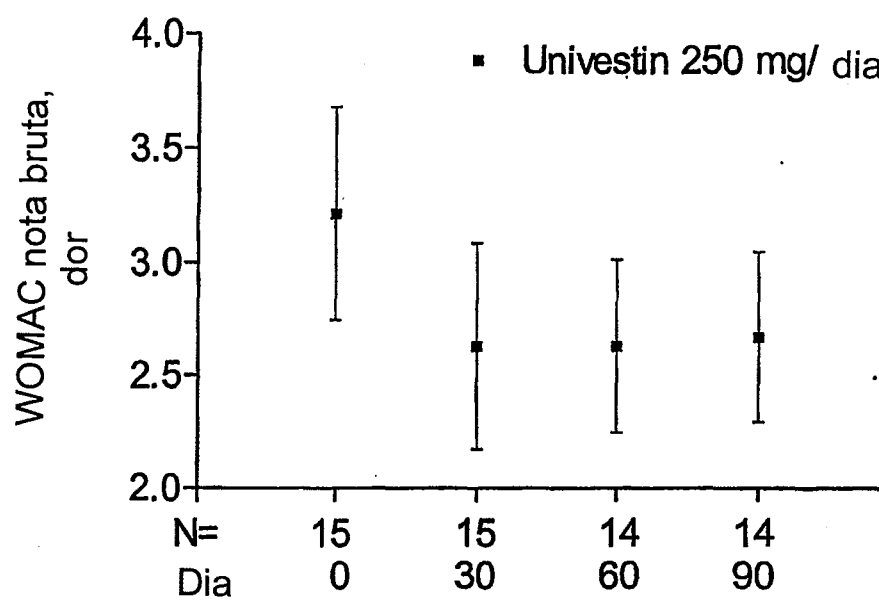
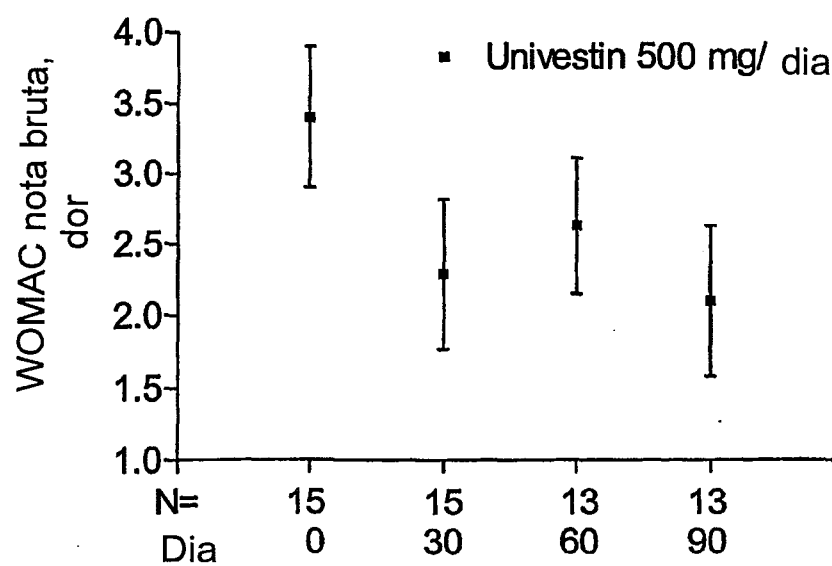
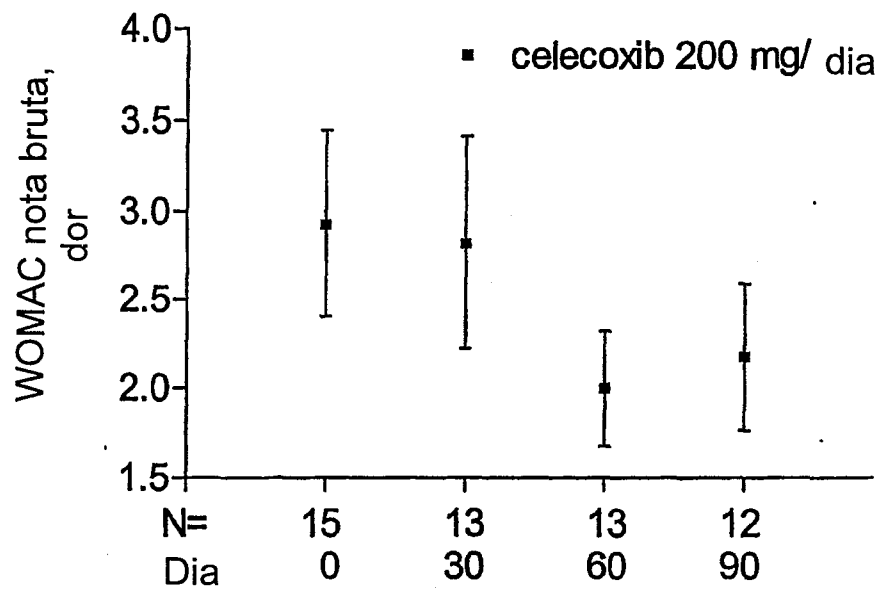
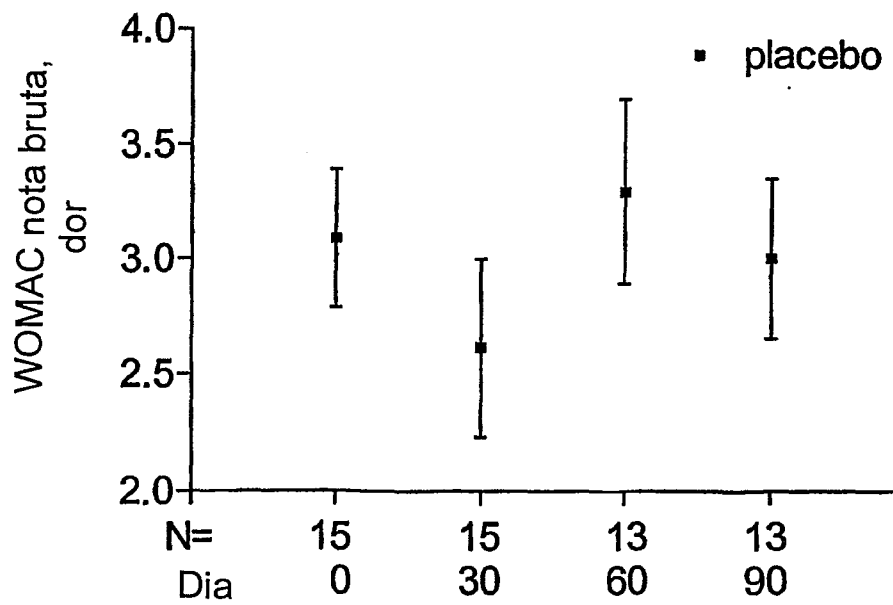
Fig. 20**Fig. 21**

Fig. 22**Fig. 23**

15/20

Fig. 24

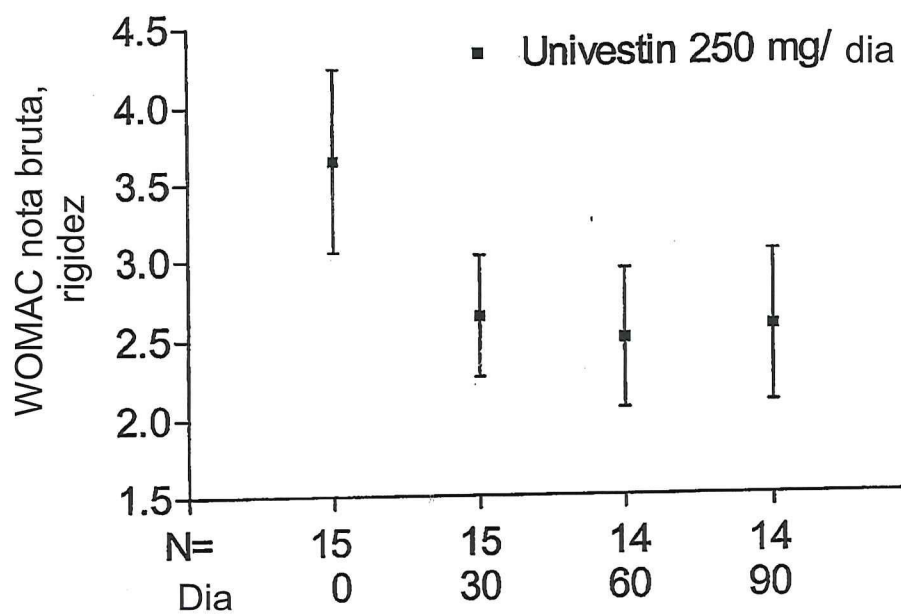


Fig. 25

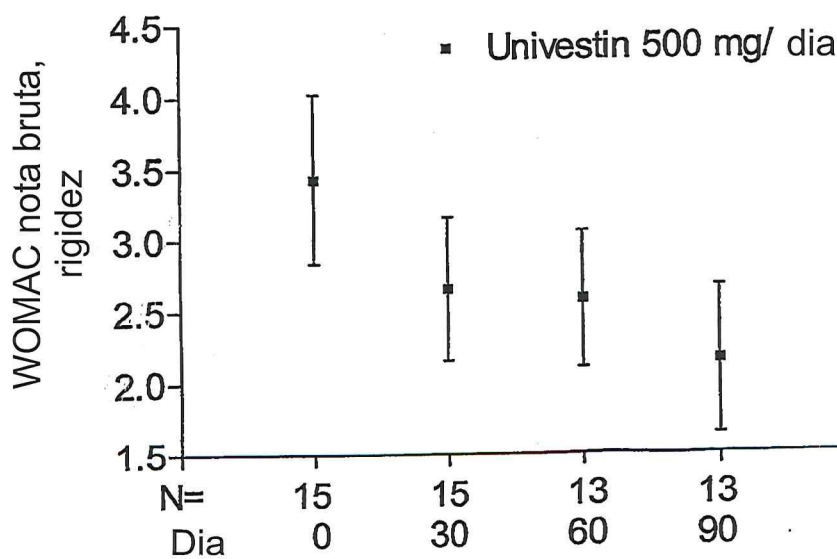


Fig. 26

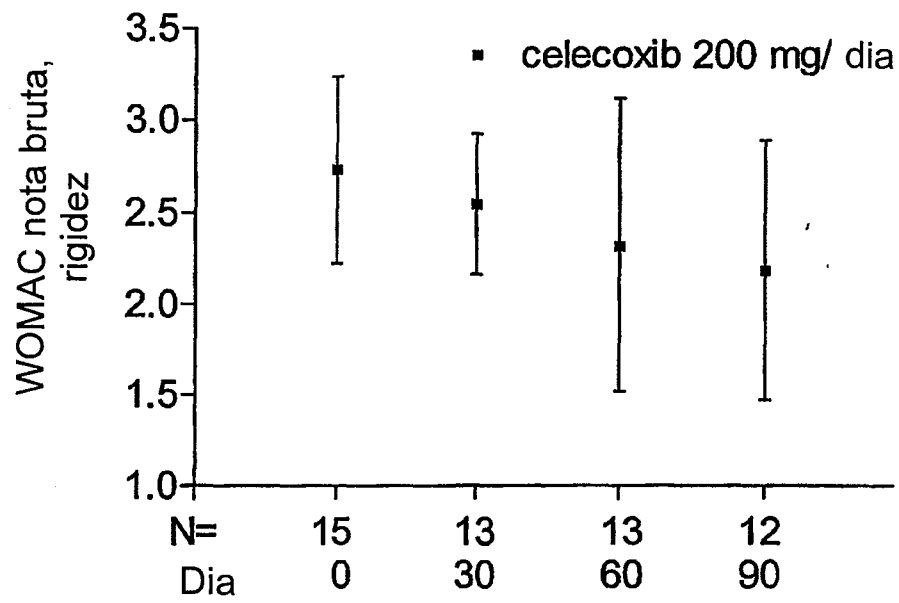


Fig. 27

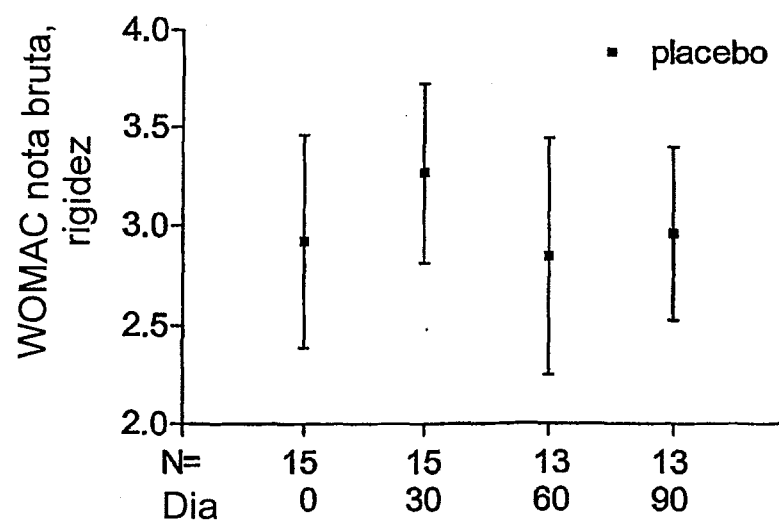


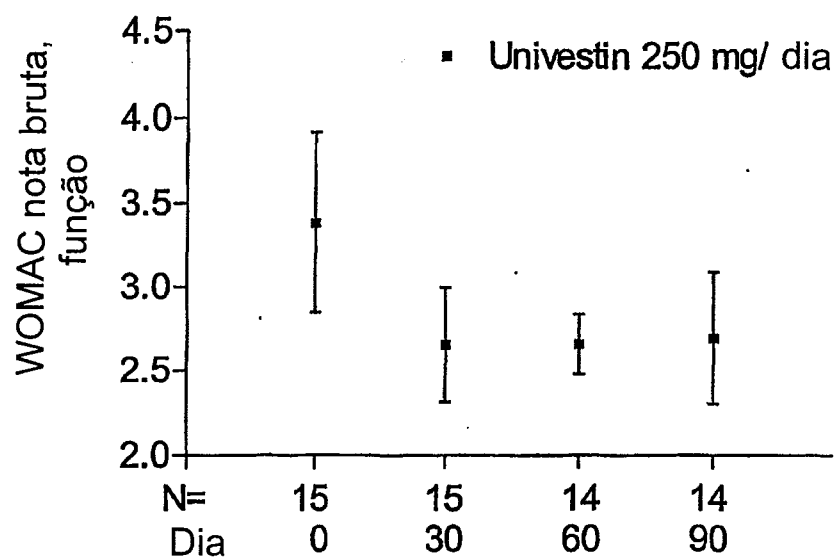
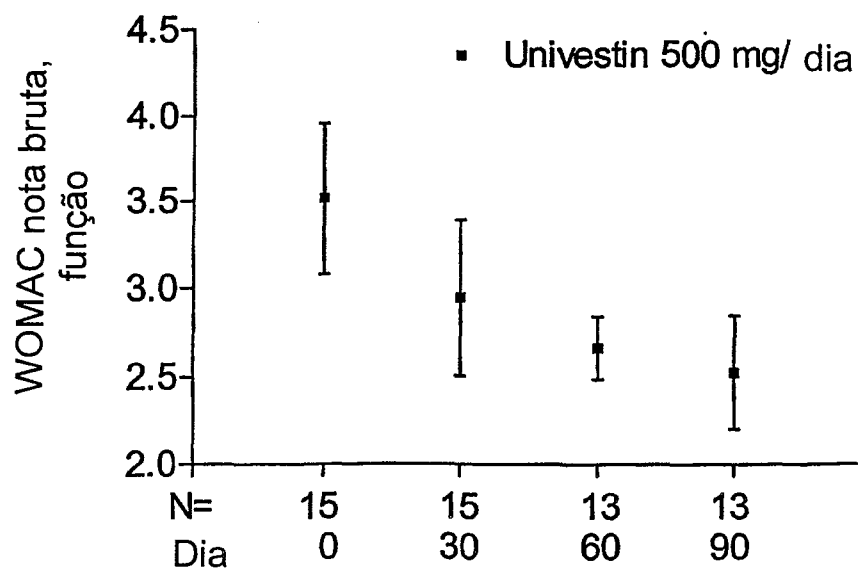
Fig. 28**Fig. 29**

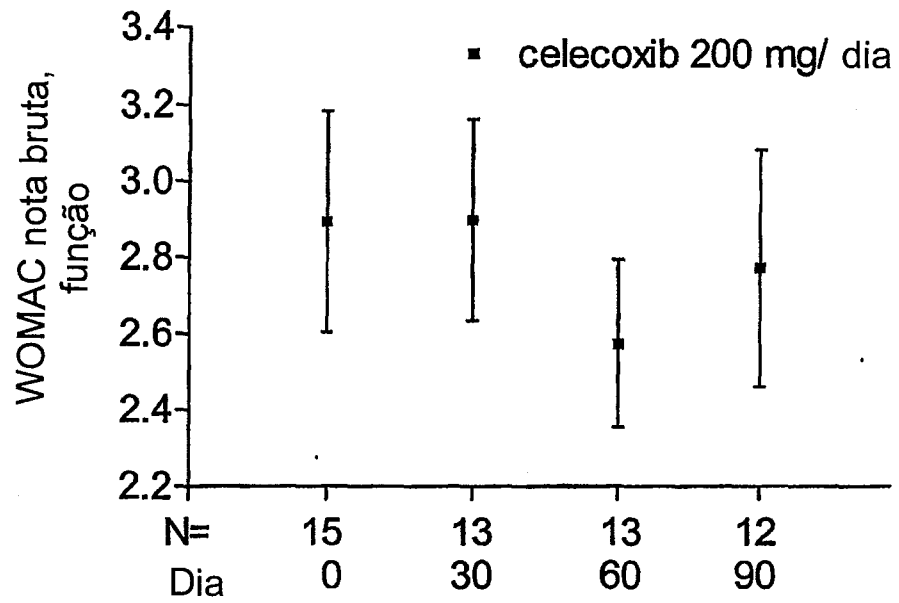
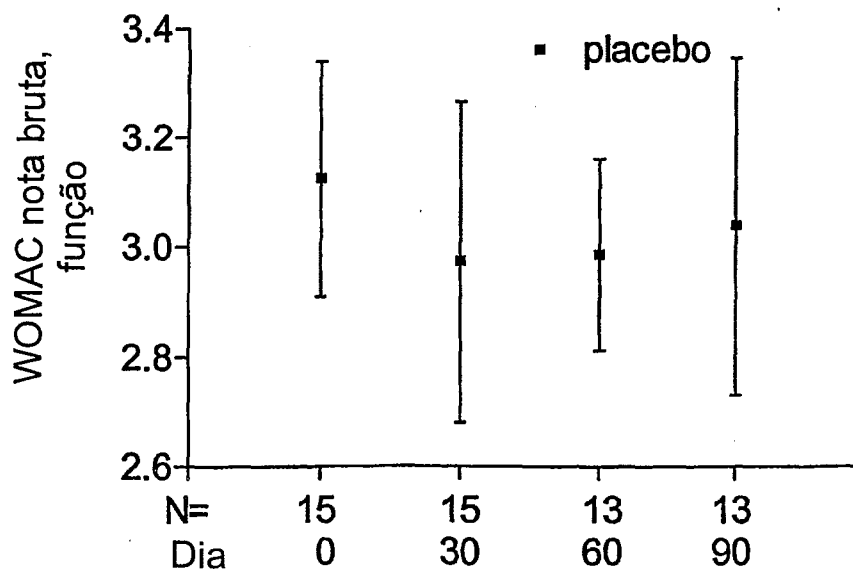
Fig. 30**Fig. 31**

Fig. 32

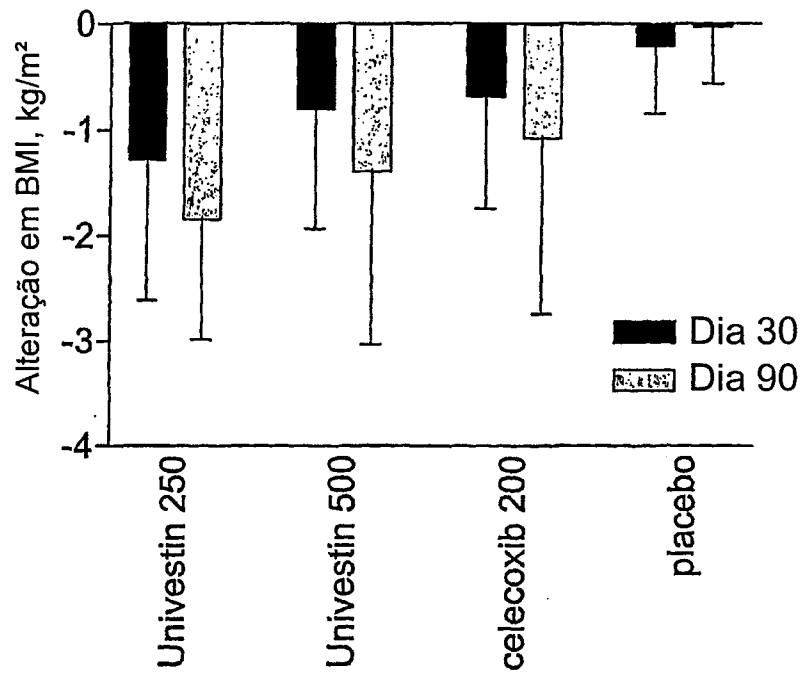


Fig. 33

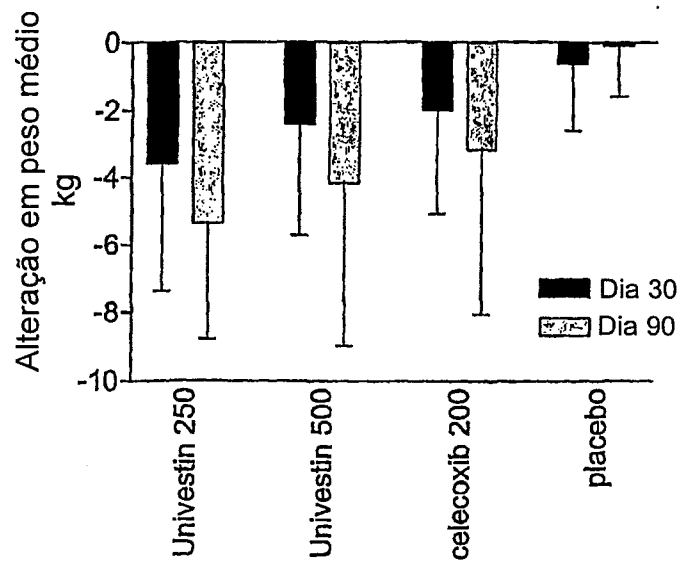


Fig. 34