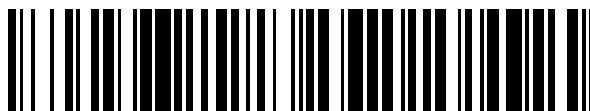


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 429**

51 Int. Cl.:

A61K 36/738 (2006.01)
A61K 36/899 (2006.01)
A61K 36/28 (2006.01)
A61K 36/328 (2006.01)
A61K 36/76 (2006.01)
A61K 36/53 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2013** **E 13164148 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019** **EP 2792389**

54 Título: **Composición farmacéutica antiviral, que contiene un extracto de Juncus acutus**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.05.2020

73 Titular/es:
GLOBAL HEALTH SOLUTIONS AG (100.0%)
Landstrasse 63
9490 Vaduz, LI

72 Inventor/es:
VOLKMAR, MONICA HERTA

74 Agente/Representante:
GONZÁLEZ LÓPEZ-MENCHERO , Álvaro Luis

ES 2 761 429 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica antiviral, que contiene un extracto de *Juncus acutus*

- 5 La invención se refiere a una composición farmacéutica, en particular para su uso como composición antiviral o agente virostático de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1.

Estado de la técnica:

- 10 *Lavandula angustifolia* (en alemán: lavanda; sinónimos usados en la bibliografía: *Lavandula officinalis*, *Lavandula vera*) se conoce desde tiempos inmemoriales como planta curativa. Los aceites esenciales tienen una acción antiinflamatoria, analgésica y antimicrobiana. Además, la planta puede acelerar la curación de heridas. En el documento US 2009/0220440 A1 se ha dado a conocer una composición para el tratamiento tópico de Herpes, que contiene entre otras cosas aceites esenciales de *Melissa officinalis* y *Lavandula angustifolia*. La *Lavandula angustifolia* se usa a este respecto debido a las propiedades que se le atribuyen (véase anteriormente) y no debido a un efecto antiviral. En combinación proporciona la composición una curación más rápida de las heridas originadas por un brote de Herpes.

- 20 *Commiphora molmol* (en alemán: mirra) se conoce como agente predominantemente antiséptico y antiinflamatorio para el tratamiento externo de infecciones de boca y faringe (inflamación de encías y otras enfermedades periodontales, inflamación de amígdalas, úlceras bucales). La mirra de sabor amargo y adstringente se usa tradicionalmente en numerosas dolencias, tal como en resfriados (alivio de la respiración nasal y expectoración), heridas y úlceras, en particular infecciones de boca, encía y faringe.

- 25 La mirra es una sustancia aromática a modo de goma, que se aísla de determinados árboles y arbustos, principalmente de la familia de las burseráceas, que crecen en África y en Oriente Medio. En la mayoría de los casos se colecta mirra como resina que se produce por la especie del árbol del caucho de mirra *Commiphora myrrha*, *Commiphora abyssinica* o *Balsamodendron myrrha*.

- 30 *Chamomilla matricaria* (designada en la bibliografía también como *Matricaria recutita* y *Chamomilla recutita*; en alemán: camomila) es un tipo de planta en la familia de las asteráceas (*Asteraceae*). Ésta es una planta curativa antigua que se usa sobre todo en dolencias de estómago e intestino y en inflamaciones.

- 35 El junco espinoso (*Juncus acutus*) es un tipo de planta halofítica de la familia de las juncáceas (*Juncaceae*).

- 40 El extracto de *Rosa damascena* (un tipo de rosa (forma cultivada)), en particular la esencia de rosas, se conoce por sus propiedades terapéuticas antiespasmódicas, antivirales y antisépticas. Es además un buen bactericida. Puede usarse en el tratamiento de tifus, diarrea, cólera, intoxicación por alimentos y otras enfermedades que se han originado por bacterias. Además cura infecciones bacterianas internas, por ejemplo en el intestino grueso, estómago, intestino y vías urinarias, así como infecciones externas en la piel, oídos, ojos y en heridas.

El sauce blanco (*Salix alba*) es un árbol frondoso del género de los sauces (*Salix*), que pertenece a la familia de las salicáceas (*Salicaceae*). Para la corteza de sauce se conocen propiedades antipiréticas, antiflogísticas y analgésicas.

- 45 Las infecciones por virus son justamente las enfermedades más resistentes de todas las enfermedades conocidas con etiología infecciosa con las que se ha luchado en la medicina clínica. Aunque tuvieron mucho éxito distintos programas de profilaxis frente a infecciones por virus, por ejemplo vacuna contra la poliomielitis, y en una dimensión más baja contra la gripe, hay muy pocos éxitos en relación con el desarrollo de terapias de curación agudas o antibióticos antivirales. En realidad son análogos de nucleósido, tal como acicloguanosina, que son eficaces en la lucha de infecciones con Herpes simplex I y II, casi los únicos agentes antivirales conocidos.

- 50 En el desarrollo de agentes eficaces y agentes profilácticos para infecciones por virus se ha invertido hasta ahora mucho dinero. Sin embargo, los resultados dejan mucho que desear. Ya que muchas infecciones por virus se han extendido mucho y en parte originan grandes daños económicos, existe una gran necesidad de agentes y agentes profilácticos eficaces y relativamente baratos para la lucha contra las infecciones por virus.

- 60 El virus VIH pertenece a los retrovirus, que se han designado también como virus de la leucemia o bien virus tumorales de ARN. A diferencia de otros retrovirus, el virus VIH no presente ninguna capacidad para la transformación celular. El desenlace mortal de la enfermedad de sida no se basa en una acción como virus tumoral, sino en la lisis de células T ayudadoras.

Aunque en los años pasados se han realizado avances en la prevención y tratamiento del SIDA, faltan todavía medicamentos que sean eficaces y no desencadenen reacciones secundarias o solo bajas reacciones secundarias.

- 65 **Objetivo**

Existe por tanto una gran necesidad de la facilitación de un agente muy compatible para la lucha contra enfermedades infecciosas virales diversas, en particular de infecciones por Herpes labialis y Herpes zoster, así como de enfermedades por VIH. En particular, un objetivo de la presente invención es proponer una preparación o composición a base de sustancias naturales, con las que puedan combatirse virus, en particular virus de la gripe, virus Herpes y virus VIH. Aún un objetivo es proponer una composición o preparación que no tenga efectos secundarios o solo bajos efectos secundarios.

Descripción

Este y otros objetivos se consiguen mediante el objeto de acuerdo con la reivindicación 1. En las reivindicaciones dependientes se han definido configuraciones ventajosas del objeto de acuerdo con la invención.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención pone a disposición por tanto una composición antiviral, es decir una composición para la prevención y/o el tratamiento o la lucha de infecciones por virus o enfermedades víricas en un ser humano o un mamífero.

El término "lucha" comprende, tal como se usa en el presente documento, tanto una profilaxis como también una terapia, es decir tanto la prevención como también el tratamiento de infecciones por virus o enfermedades víricas, incluyendo un alivio o paliación de síntomas, o un detenimiento o una ralentización del avance o del desarrollo de la enfermedad o infección. El término "antiviral" incluye todas las formas de acción contra el virus, incluyendo una actividad en la prevención o reducción de la infección por el virus, o la transmisión del virus al huésped, la supervivencia del virus o la proliferación del virus, etc..

Sorprendentemente se determinó que una composición, que presenta un extracto del tipo de planta junco espinoso (*Juncus acutus*) y otro tipo de planta del grupo de sauce blanco, en particular *Salix alba*, rosa, en particular *Rosa damascena*, camomila, en particular *Chamomilla matricaria*, lavanda, en particular *Lavandula angustifolia* y mirra, en particular *Commiphora molmol* como sustancias constitutivas, es eficaz en la prevención de infecciones por virus o el tratamiento o paliación de los síntomas de infecciones por virus.

Esta determinación es destacable, dado que un extracto de junco espinoso y extractos de rosa, camomila, lavanda, sauce blanco y mirra, tal como se ha expuesto anteriormente, se han usado ya desde hace mucho tiempo por el ser humano en gran alcance, y aun cuando se conoce que las plantas curativas mencionadas anteriormente tienen distintas propiedades medicinales. Así se atribuye por ejemplo a extractos de rosa, camomila y lavanda entre otras cosas también una acción antiviral, aun cuando ésta no pertenece a su aplicación principal. Sin embargo hasta ahora no se ha proporcionado nunca una indicación o no se ha hecho una propuesta de que pudiera ser útil una combinación de acuerdo con la invención, que contiene estos extractos, en el tratamiento y/o prevención de infecciones por virus o enfermedades víricas en seres humanos u otros animales.

Tanto extractos del junco espinoso como también extractos de rosa, camomila, lavanda, sauce blanco y mirra se conocen y pueden obtenerse en el comercio. Estos extractos pueden obtenerse en distintas formas, por ejemplo como resinas, tinturas u otras soluciones, polvo. Éstos pueden obtenerse de la corteza, de la resina, de la hierba, de la inflorescencia de la planta. Las fuentes o preparaciones adecuadas de las plantas mencionadas anteriormente se han descrito en detalle en la bibliografía o pueden obtenerse de manera habitual en el comercio. Así se usan para la preparación del extracto las flores de camomila, rosa y lavanda, la pez de la mirra, la corteza del sauce blanco y la hierba del junco espinoso. Preferentemente tiene lugar a este respecto la extracción con alcohol al 96 % a temperatura ambiente (maceración).

Los extractos del junco espinoso como también de la rosa, camomila, lavanda, sauce blanco y mirra de las partes de plantas adecuadas o secreciones de plantas (por ejemplo resina de mirra) pueden prepararse usando uno o varios disolventes, tal como agua, etanol, metanol, hexano, éter, acetona, acetato de etilo, tolueno, benceno, propilenglicol, glicerol y similares o una mezcla de los mismos. Dependiendo del estado de la fracción de extracto o preparación puede separarse una parte de la fracción de extracto por ejemplo del disolvente mediante evaporación y entonces se usa directamente como extracto con propiedades antivirales.

En la presente invención pueden usarse también derivados y análogos del junco espinoso, de la rosa, camomila, lavanda, sauce blanco y mirra. Éstos se subsumen en el contexto de la presente invención con los términos generales "junco espinoso", "rosa", "camomila", "lavanda", "sauce blanco" y "mirra".

Ventajosamente comprende el género de planta lavanda las especies de planta *Lavandula officinalis*, *Lavandula stoechas*, *Lavandula dentata*, *Lavandula latifolia*. Adicionalmente puede comprender el género de planta rosa las especies de planta *Rosa canina*, *Rosa chinensis*, *Rosa hybrida*, *Rosa manetti*, *Rosa nitida* y *Rosa multiflora*.

Cada uno de los procedimientos discrecionales descrito en el estado de la técnica para la obtención de extractos del junco espinoso, de la rosa, camomila, lavanda, sauce blanco y mirra puede usarse para la realización de la presente invención. Las tinturas (es decir soluciones alcohólicas o acuoso-alcohólicas) del junco espinoso, de la rosa, camomila, lavanda, sauce blanco y mirra son productos habituales en el comercio que pueden usarse de manera conveniente de

acuerdo con la invención.

Las sustancias constitutivas activas pueden encontrarse con uno o varios vehículos, disolventes, diluyentes y/o sustancias base habituales, para preparar preparaciones habituales, tal como comprimidos, píldoras, polvo, pastillas, almohadillas, cápsulas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como sólido o en un medio líquido), pomadas, cápsulas de gelatina blanda y dura, preparaciones para aplicación local, polvo envasado de manera estéril, colutorios o enjuagues bucales y similares.

Ejemplos de vehículos, sustancias base y diluyentes adecuados son lactosa, glucosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma de acacia, fosfato de calcio, alginato, goma tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe de agua, agua, agua/etanol, etanol, agua/glicol, agua/polietileno, glicol, propilenglicol, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, aceite mineral o sustancias grasientas, tal como grasa dura, o mezclas adecuadas de los mismos. Las composiciones pueden contener adicionalmente agentes de deslizamiento o bien lubricantes, agentes humectantes, emulsionantes, agentes de suspensión, conservantes, edulcorantes, sustancias aromáticas o bien sustancias de sabor y similares. El medicamento puede formularse de modo que proporciona tras la administración al paciente una liberación rápida, constante o retardada de las sustancias constitutivas activas.

En el contexto de la presente invención se prefieren en particular extractos de especie de planta "Juncus acutus", de los extractos del género de planta "sauce blanco" en particular extractos de especie de planta "Salix alba", de los extractos del género de planta "rosa" en particular extractos de especie de planta "Rosa damascena", de los extractos del género de planta "camomila" en particular extractos de especie de planta "Chamomilla matricaria", de los extractos del género de planta "lavanda" en particular extractos de especie de planta "Lavandula angustifolia" y de los extractos del género de planta "mirra" en particular extractos de especie de planta "Commiphora molmol". Los extractos de las especies de plantas mencionadas anteriormente han resultado especialmente ventajosos y eficaces en el tratamiento de enfermedades e infecciones virales, cuando se usan conjuntamente los extractos mencionados anteriormente.

A continuación se caracterizan en más detalle ejemplos de realización de la invención por medio de ensayos y estudios realizados.

Producción de virus pseudotipificados con VSV y recombinantes de VIH-1. Las poblaciones de virus de alta titulación pseudotipificadas con VSV o recombinantes de VIH-1 se produjeron en células 293T mediante cotransfección de pNL4-3.Luc.R-E, codificando o bien el pcDNA3-VSV o el plásmido epNL3 la proteína G del virus de estomatitis vesicular o bien el gen de envoltura de VIH-1 usando el sistema de transfección de fosfato de calcio. Los sobrenadantes, que contienen las existencias de virus, se extrajeron 48 horas tras la transfección y se centrifugaron durante 5 minutos a 500 g para separar los restos de células y se almacenaron hasta su uso a -80 °C. Las existencias de virus libres de célula se sometieron a ensayo usando un inmunoensayo enzimático para la detección del antígeno de VIH (p24) y los cultivos se sometieron a ensayo con una dosis de 200 ng de proteína VIH-1-Gag (p24).

Ensayo de infección por VIH-1 pseudotipificado con VSV

Se colocaron en placa células de pulmón A549 epiteliales (106/ml) en una placa de 24 pocillos y se trataron previamente durante 30 minutos con las sustancias de prueba. Tras el tratamiento previo se inocularon las células con poblaciones de virus (200 ng de p24) y 12 horas más tarde se lavaron las células dos veces en PBS y se lisaron durante un espacio de tiempo de 15 min a TA en Tris-fosfato 25 mM pH 7,8, MgCl₂ 8 mM, DTT 1 mM, 1 % de Triton X-100 y 7 % de glicerol. Entonces se sometieron los lisados a la tecnología Spin-Down y los sobrenadantes se usaron para medir la actividad luciferasa usando un AutoLumat LB 9510 (Berthold, Bad Wildbad, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del kit de ensayo de la luciferasa (Promega). Los resultados se representan como % de la infección (considerando las células infectadas y no tratadas el 100 % de infección). Los resultados representan el valor medio \pm DE de 3 experimentos distintos. En otra serie de experimentos se infectaron las células y se trataron 30 minutos más tarde con la sustancia de ensayo.

En los ensayos descritos a continuación se usó en cada caso una composición que contiene extractos de Juncus acutus, de Salix alba, Rosa damascena, Chamomilla matricaria, Lavandula angustifolia y de Commiphora molmol y concretamente se preparó tal como se describe en el ensayo 7 a continuación.

Ensayo 1: Actividad antiviral de la composición y mecanismo de acción

La actividad anti-VIH de la composición se midió por medio de la influencia sobre la transcripción génica del virus. A este respecto resultó que la composición presenta otro mecanismo de acción distinto de los fármacos antivirales clásicos: estos últimos actúan mediante inhibición de la activación de las células T también de manera inmunosupresora (lo que es indeseable), mientras que la presente composición no mostró ningún efecto de inmunosupresión.

Declaraciones con respecto a la inmunosupresión pudieron deducirse de la prueba de células Jurkat infectadas por VIH en el modelo de transcripción génica VIH-LTR con activación de células T mediante células inmunitarias CD3/CD8.

Se sabe que los fármacos antivirales por regla general tienen la acción secundaria indeseada de inhibir la activación de células T. Sin embargo, la composición de acuerdo con la invención no presenta este efecto de inhibición indeseado para la terapia.

- 5 Acciones de la composición sobre la proliferación del virus en células infectadas por VIH en el modelo de la infección por lentivirus pseudotipificada con VSV (se trata en este caso de un modelo de VIH que evita las etapas normales de la infiltración del virus en la célula y con ello permite una evaluación mejor del punto de ataque.

10 Ensayo 2: Activación de LTR

En el caso de Jurkat-LTR-GFP se trata de un clon obtenido de células Jurkat, que está infectado de manera latente con un virus recombinante que contiene el gen GFP controlado por el promotor VIH-LTR [Márquez N, Calzado MA, Sánchez-Duffhues G, Perez M, Minassi A, Pagani A, Appendino G, Díaz L, Muñoz-Fernández MA, Muñoz E. (2008), Differential effects of phorbol-13-monoesters on human immunodeficiency virus reactivation (Acciones diferenciales de monoésteres de forbol-13 sobre la reactivación del virus de la inmunodeficiencia humana). Biochem Pharmacol. 75:1370-80]. Las células Jurkat-LAT-GFP expresan CD3 y CD28 y pueden estimularse con AcM anti-CD3 y anti-CD28. Las células se estimularon durante 12 horas y la expresión de GFP se analizó mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo del tipo FACSCanto II. Se recontaron los diez mil acontecimientos por muestra y se determinó el patrón de fluorescencia.

20 Durante el tratamiento previo de las células antes de la infección se reduce la tasa de la proliferación del virus en la célula. La composición inhibe la transcripción de los genes del virus y con ello la biosíntesis de nuevos virus.

- 25 Partiendo de estos ensayos previos se realizaron experimentos con una forma de la composición con contenido en alcohol reducido, para restringir adicionalmente el mecanismo de la inhibición de la replicación del VIH-1.

Ensayo 3: Efecto sobre la replicación del VIH pseudotipificada con VSV en células epiteliales del pulmón

30 Durante el tratamiento previo con una dilución al 0,5 % de la preparación (= solución alcohólica al 0,5 % del concentrado del ensayo 7) se impidió completamente la infección de las células. Si las células se infectaron en primer lugar y entonces se trataron con la composición, se mostró sin embargo un efecto de inhibición sobre la transcripción del virus: de nuevo era la inhibición completa con una concentración del 0,5 % de la preparación.

- 35 En los distintos ensayos se usó del 0,001 al 1 % p/p, preferentemente del 0,01 al 0,1 p/p de soluciones acuosas del extracto alcohólico para la incubación de las células.

Ensayo 4: Efecto sobre la replicación del virus inducida por TNF- α en células HeLa:

40 Se usó un modelo establecido de la latencia de VIH-1 y de la replicación activa a base de la infección de las células HeLa con baja multiplicidad de la infección (MOI) con partículas obtenidas de VIH, en el que se codifica el minigenoma en plásmido pEV731 (LTR-Tat-IRES-GFP-LTR). Las células se clasificaron mediante expresión de GFP y las células HeLa-GFP representan células infectadas de manera latente con VIH-1, que pueden reactivarse mediante estímulos externos tal como citocinas o éster de forbol. Las células HeLa-GFP+ presentan una infección por VIH-1 productiva. Las células se trataron durante 12 horas y la expresión de GFP se analizó mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo del tipo FACSCanto II. Se recontaron diez mil acontecimientos por muestra y se determinó el patrón de fluorescencia. Para someter a ensayo la actividad potencial de la sustancia de prueba sobre la transcripción génica de VIH-LTR, se usaron las células HeLa-LAT-GFP que contienen un provirus de VIH integrado, completo individual, en el que se sustituyó GFP por Nef. Esta sustitución permite una rápida evaluación de la actividad de transcripción del VIH mediante detección por citometría de flujo de la epifluorescencia de GFP, cuando agonistas externos tal como activadores de PKC o citocinas activan las células. Las células se incubaron previamente con concentración creciente de la composición y a continuación se estimularon durante un espacio de tiempo de 12 horas con TNF α (10 ng/ml).

- 45 Los ensayos mostraron que una forma de la composición con contenido en alcohol reducido al 0,5 % (a este respecto la solución alcohólica que tras la extracción contiene entre el 80 % y el 93 % de alcohol, el resto agua, se diluye con agua tanto que se forme una forma con contenido en alcohol reducido al 0,5 %) inhibe la transactivación del virus VIH en un 50 % o de manera aún más precisa, inhibe la replicación del virus y la actividad de transcripción en el promotor VIH-LTR. Según esto, la composición representa una sustancia inhibidora potente tanto de la incorporación de VIH-1 en el genoma de la célula huésped, como también de la proliferación del virus. La activación de NF-kappa B (= NPkB) es uno de los mecanismos que conduce a la lectura de los genes del virus y con ello a la replicación del virus. Que VIH-1 se incorporara en el genoma, pudo deducirse de los ensayos en células A549 con el ensayo de la luciferasa, donde se muestra un efecto de la incubación previa.

- 50 El tratamiento previo de las células 30 min. antes de la infección con dosis creciente de la composición condujo a una inhibición de la actividad luciferasa dependiente de la dosificación. De manera interesante resultó que la actividad inhibidora de la composición desapareció, después de que las células se infectaran y se añadiera la sustancia de prueba 30 minutos más tarde. Esto sugiere que la actividad inhibidora se suspendió al tener como objetivo etapas

tempranas en el ciclo de vida del virus (es decir transcriptasa inversa o integración viral).

TNF α se descubrió en la mitad de los años 70 como un factor sérico que puede inducirse mediante endotoxina. El nombre de la proteína se deriva de su capacidad de necrotizar en un experimento con animales células de tumores trasplantados así como de provocar la destrucción celular de líneas de células neoplásicas en experimentos *in vitro*. El TNF α humano se sintetiza inicialmente como proteína transmembrana de 233 aminoácidos (AA) de longitud y puede disociarse de la membrana celular a continuación como una proteína no glicosilada, de 157 aminoácidos de longitud.

TNF α desempeña un papel clave en el inicio y desarrollo de una inflamación. Con la eliminación de patógenos microbianos y virus conduce esta citocina a la migración y activación de granulocitos neutrófilos y monocitos en el sitio de la infección. Además de estas acciones locales, TNF α puede provocar efectos sistémicos tal como fiebre y caquexia, así como la síntesis de proteínas de fase aguda del hígado y la activación de linfocitos. TNF α es a su vez un inductor de NF-kappaB, que durante la activación proporciona una lectura de los genes del virus (véase la descripción posterior).

Ensayo 5: Mecanismos de acción de la composición

La estimulación de células infectadas con TNF- α desencadena la lectura de los genes del virus y con ello la proliferación del virus. Esta activación se inhibe como máximo a la mitad con una solución al 0,2 por ciento de la preparación.

Esta inhibición no tiene lugar en el plano de gen del virus, sino que en células Jurkat puede deberse a una inhibición de la activación de NF-kB (=factor nuclear "potenciador de cadena ligera kappa" de células B activadas) en la célula, y con ello a un mecanismo por encima del plano de los genes del virus – probablemente mediante inhibición de una o varias cinasas, que – desencadenado por TNF- α , activan por su parte a NF-kB, lo que conduce entonces a su vez a la lectura de una familia génica completa, entre otras cosas también de los genes del VIH. La inhibición de esta cinasa de activación de NF-kB mediante la composición conduce con ello de manera indirecta a una inhibición de la lectura del gen del virus.

Ensayo 6: Efectos inmunomoduladores de la preparación en células T humanas del sistema inmunitario

Otra serie de ensayo sirvió para el estudio de efectos inmunomoduladores de la preparación en células T humanas del sistema inmunitario. La preparación inhibió de manera dependiente de la dosis la activación estimulada de células T. La inhibición de NF-kB se refleja en que en este ensayo se redujeron los marcadores superficiales CD69 activados mediante este sistema.

Análisis por citometría de flujo de la expresión de antígeno de la superficie celular (procedimiento para los marcadores superficiales)

Las células sanguíneas mononucleares periféricas se estimularon con SEB durante los espacios temporales indicados, elevándose o bien no elevándose las concentraciones de la composición y la expresión en superficie de los antígenos CD25 (72 h), CD69 (24 h) se analizó con AcM específicos mediante citometría de flujo. CD25 es la cadena del receptor de interleucina-2 con baja afinidad y se expresa en células T y B activadas y macrófagos activados. CD25 se determinó con el AcM R0811 (conjugado con PE) de Dako (clon ACT-1). Las células T en reposo no expresan CD69, sin embargo éste se regula por incremento mediante activación in-vitro de las células T. CD69 es un antígeno de activación temprana, que se expresa antes que CD25 y CD71. La expresión de CD69 se determinó mediante un AcM marcado con FITC (clon FN50) de BD Pharmigen.

Los marcadores superficiales se expresan durante la activación de la célula infectada en reposo. La expresión de CD69 se encuentra en relación con un mecanismo controlado por NF-kappaB. Por tanto ha de esperarse que una sustancia que inhibe NF-kappaB inhiba también la formación del marcador superficial CD69.

Ensayo 7: Aplicación de la preparación en cultivos celulares

Para la preparación de 200 litros de la composición antiviral (que corresponde aproximadamente a 200 kg) se extrajeron las siguientes cantidades de producto de partida (en cada caso producto seco) con etanol puro al 96 % (el resto agua purificada):

flores de camomila (inflorescencia con cabeza de flor y flor)	4,00 kg
flores de rosa (Rosa damascena)	8,00 kg

(continuación)

flores de lavanda	1,20 kg
mirra (resina)	0,07 kg
hierba de junco (<i>Juncus acutus</i>)	3,00 kg
corteza de sauce	0,80 kg

5 Tras la extracción (maceración) del producto de extracción se redujo el contenido en alcohol mediante la absorción de agua residual de las plantas secadas hasta por debajo del 90 %. Este extracto alcohólico se diluyó para su administración en ser humano con agua hasta obtener un contenido en alcohol del 0,1 al 1,0 %.

10 Se ha mostrado que la actividad del extracto como agente antiviral no se altera cuando la extracción se realiza con una mezcla acuosa de alcoholes, que contiene al menos el 80 % de etanol. Preferentemente se realiza la extracción con etanol a del 90 al 96 % (el resto agua).

Los extractos individuales se prepararon en el laboratorio con imitación de las condiciones del extracto total (etanol al 90 % v/v) como agente de extracción. Para cada extracto individual se extrajo la cantidad proporcional de la respectiva planta, tal como se obtiene también en la composición.

15 Se sometió a ensayo en el modelo de la activación de VIH-1 inducida por TNF α y/o PMA en células Jurkat infectadas.

Procedimiento:

20 En el caso de Jurkat-LTR-GFP se trata de un clon obtenido de células Jurkat, que está infectado de manera latente con un virus recombinante, que contiene el gen GFP controlado por el promotor VIH-LTR. Las células Jurkat-LAT-GFP reaccionan frente a TNF α y PMA, que activa la ruta canónica de la activación de NF- κ B.

25 En primer lugar se incubaron previamente las células con concentraciones crecientes de las sustancias vegetales individuales (vol/vol), para determinar la citotoxicidad. Los ensayos de la citotoxicidad se realizaron mediante tinción de yoduro de propidio y medición de las células muertas por citometría de flujo. Las concentraciones se encontraban entre el 0,01 % y el 1 % (v/v) y fueron no citotóxicas en la mayoría de las sustancias vegetales analizadas.

30 Las células Jurkat-LAT-GFP se incubaron previamente durante 30 minutos con concentraciones crecientes de las sustancias de ensayo y se estimularon entonces durante 12 horas con o bien TNF α (2 ng/ml) o PMA (10 ng/ml). Finalmente se analizó la expresión de GFP mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo del tipo FACSCanto II. Se recomptaron diez mil acontecimientos por muestra y se determinó el patrón de fluorescencia.

35 La composición de acuerdo con la invención redujo la proliferación del virus en el cultivo celular. Con una dilución de la composición con agua en una relación de 1:10.000 se observó una reducción de 1000 veces del título del virus de VIH-1. Con la dilución de 1:30.000 se consiguió la reducción todavía en el factor 300. Para VIH-2 pudo observarse con una dilución de 1:10.000 una reducción del título de 30 veces.

Se determinó la infecciosidad de una serie de dilución de virus VIH mediante evaluación de la patogenicidad celular:

- 40
- Disposición de células Jurkat-CD4 con un número de células ajustado (por ejemplo 6.000.000/Napf)
 - La composición se preparó en una serie de dilución en el medio. 500 μ l de la respectiva dilución se añadieron al medio y se incubaron.
- 45
- 50 μ l de la dilución del virus de referencia se añadieron al cultivo celular y se incubaron.
 - Se separaron medio y células mediante centrifugación. En el sobrenadante se determinó el título del virus mediante ensayo de titulación estándar.
- 50
- Las propias células se incubaron en medio con diluciones de V.II-BE durante 28.
 - Al final de la duración del ensayo se evaluó el efecto patógeno celular.

55 Una incubación de seis horas con la composición condujo a una inactivación de VIH dependiente de la dosis. Con una dilución de 1:10.000 en el medio en la relación indicada, la preparación redujo la infecciosidad de VIH-1 en el factor 400.

Ensayo 8: Acción sobre virus VIH-1 y VIH-2 en un cultivo celular

60 Con una dilución de la composición (obtenida según el ensayo 7) en 1:10.000 y con un tiempo de incubación de 6 h se obtuvo una reducción de 400 veces de la infecciosidad de VIH-1 en células Jurkat.

Con una dilución de la composición en 1:10.000 y con un tiempo de incubación de 6 h se obtuvo una reducción de 30 veces de la infecciosidad de VIH-2.

- 5 Con una dilución de la composición en 1:200 y con un tiempo de incubación de 6 h se obtuvo una reducción de 160 veces del título del virus (VIH, no especificada). En comparación con esto se obtuvo con una muestra control con una dilución de 1:300 una reducción de aprox. 10 veces del título del virus, y con una dilución de 1:1000 a 10.000 una reducción únicamente de aproximadamente 3.
- 10 La composición redujo por consiguiente la infecciosidad de VIH-1 y VIH-2 en el cultivo celular en medida muy considerable.

Ensayo 9: Estudio de la toxicidad de la preparación

- 15 Para el estudio de la toxicidad crónica no pudo usarse directamente la preparación, ya que la concentración de alcohol habría sido el factor limitante de la dosis. Por este motivo se preparó un polvo con una composición de manera correspondiente a las relaciones de cantidad en el extracto total. A este respecto correspondían las relaciones de cantidad en la mezcla de polvo a aquellas de la composición líquida. Este polvo se administró entonces por vía oral por sonda gástrica a ratas Wistar.

20 En la primera etapa se realizó de manera correspondiente a las reglas de estudios toxicológicos un estudio previo durante siete días. En este estudio previo se usaron dosis hasta 1000 mg de la mezcla de polvo por kg de peso corporal. No se observaron indicios de toxicidad.

- 25 A este estudio previo le siguió el estudio de toxicidad de tres meses con una duración de observación posterior de cuatro semanas. Se sometieron a ensayo además de las observaciones macroscópicas parámetros de laboratorio y la histopatología. El estudio se realizó en concordancia con determinaciones vigentes para la realización de estudios toxicológicos con tres dosis: 25 mg/kg como dosis baja, 75 mg/kg como dosis media y 250 mg/kg como dosis alta. Con estas dosis no se observaron señales de toxicidad de ningún tipo.

30 De los resultados obtenidos puede deducirse que también con sobredosis intencionada, por ejemplo ingesta del contenido de toda una botella, no han de esperarse efectos tóxicos.

Ensayo 9.: Acción sinérgica de los componentes individuales

- 35 Se prepararon en el laboratorio extractos individuales de las seis partes constituyentes vegetales. Como modelo sirvió la activación de VIH inducida por TNF- α o PMA en células Jurkat infectadas (iguales condiciones de ensayo tal como se ha descrito anteriormente).

40 Entre las sustancias individuales se mostraron a este respecto refuerzos sinérgicos entre las partes constituyentes rosa y camomila así como rosa y lavanda.

1º Estudio: Determinación del título de VIH y número de células CD4

- 45 Se sometió a estudio la cuestión del efecto de la preparación sobre la carga vírica y el número de células CD4 como parámetros principales del diagnóstico de VIH. Los pacientes con VIH diagnosticado tenían una carga vírica < 50.000 copias/ml de sangre y un número de CD4+ de en promedio > 500 células/ μ l de sangre. Éstos obtuvieron durante un espacio de tiempo de al menos de 60 a 180 días 60 gotas 2x al día de una preparación al 0,5 por ciento de la composición tras la evaporación del agente de extracción.

50 En la tabla 1 están representados gráficamente los datos de estos pacientes con distintas duraciones de exposición (hasta cuatro meses, en dos casos incluso seis meses). Se midieron además de los títulos de VIH y números de células CD4 también parámetros de laboratorio clínicos como medida de la seguridad de aplicación. En los parámetros de seguridad no se observaron modificaciones indeseadas. Por el contrario se muestran además de una reducción de la carga vírica (en muchos casos por debajo del límite de detección) sin excepción aumentos del número de células CD4, lo que en el caso de pacientes con VIH va acompañado de una mejora de la función inmunitaria (tabla 2).

55 Dado que en este estudio se ingresaron solo pacientes con carga vírica comparativamente baja (en el intervalo del límite de detección), se encontraba el punto esencial de la evaluación en el efecto de la preparación sobre el número de células CD4.

60 Se calculó un aumento significativo de las células CD4 en promedio en el 89,53 % (tabla 2). El análisis estadístico se realizó con la hipótesis de que en los pacientes que no habían conseguido la duración de exposición de tres meses, no pudo llegarse a un empeoramiento de los valores. A este respecto se obtiene para el número de células de CD4 también entonces aún un valor altamente significativo, cuando en el caso del número alto poco realista del 50 % de los casos documentados se hubiera producido un empeoramiento. Los resultados observados son por tanto

clínicamente de alta relevancia así como estadísticamente significativos y robustos.

5 La aplicación de la preparación puede cerrar con ello un hueco de terapia: hasta ahora no es posible ofrecer a pacientes infectados por VIH, en estadios de enfermedad sin molestias agudas de inmunodeficiencia, una ayuda para el control de la carga vírica y la protección de la función inmunitaria.

2º Estudio: Tratamiento de Herpes labialis

10 La inmunodeficiencia desencadenada por VIH favorece la aparición de infecciones virales oportunistas tal como Herpes labialis. En una documentación de datos de casos se estudió por tanto si el uso de la preparación puede tener una influencia sobre el desarrollo de episodios de Herpes labialis.

15 Esta documentación de datos de casos (tabla 3) muestra en comparación con valores bibliográficos un acortamiento de la duración de episodios de Herpes clínicamente relevante y estadísticamente significativo en comparación con Aciclovir y placebo en al menos 2,5 o bien 3,1 días (49,0 % o bien 54,4 % de reducción de la duración de la curación hasta la formación de costra).

Con ello mostró la preparación también efectos antivirales contra Herpes labialis.

20 La tabla 4 muestra que la composición de acuerdo con la invención inhibe de manera dependiente de la dosis la transactivación de VIH-LTR inducida por TNF α en células Jurkat 5.1.

25 Otros estudios que la parte inventora ha podido realizar muestran que un extracto del junco espinoso inhibe sorprendentemente de por sí solo la transactivación de LTR inducida por VIH - Tat (*trans-activator of transcription*). Esto es un nuevo conocimiento que no se había documentado aún hasta ahora en la bibliografía. Por otro lado se determinó que el junco espinoso no activa la ruta de señalización MAPK e inhibe la activación de ERK y JNK (MAPK) inducida por PMA.

30 Las actividades combinadas anti-Tat (procedente del junco espinoso) y anti-NF κ B (que se atribuye probablemente a los extractos de flores de rosa y sauce) pudieron explicar la actividad anti-VIH-1 potente determinada in vitro de la composición de acuerdo con la invención.

Otros resultados hallados son:

35 Extractos de mirra, flores de rosa y corteza de sauce activaron la ruta de señalización JNK.
Extractos de mirra, flores de rosa y lavanda activaron la ruta de señalización ERK.
Extractos de flores de rosa y camomila reforzaron la activación de LTR inducida por VIH - Tat.

REIVINDICACIONES

5 1. Composición farmacéutica adecuada para su uso como composición antiviral o agente viroestático, que contiene extractos de especie de planta de junco espinoso y de los géneros de plantas rosa, camomila, lavanda, sauce blanco y mirra como partes constituyentes eficaces.

10 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, **caracterizada por que** de los extractos del género de planta "sauc blanco" se usan extractos de especie de planta "Salix alba", de los extractos del género de planta "rosa" se usan extractos de especie de planta "Rosa damascena", de los extractos del género de planta "camomila" se usan extractos de especie de planta "Chamomilla matricaria", de los extractos del género de planta "lavanda" se usan extractos de especie de planta "Lavandula angustifolia" y de los extractos del género de planta "mirra" se usan extractos de especie de planta "Commiphora molmol".

15 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, que puede obtenerse mediante extracción con una mezcla acuosa de alcoholes que contiene al menos el 70 % en peso y de manera especialmente preferente al menos el 85 % en peso, de alcohol, usándose como alcohol preferentemente metanol, etanol o propanol, o una mezcla de los alcoholes mencionados anteriormente.

20 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, que puede obtenerse mediante extracción de las cantidades mencionadas a continuación de producto de partida, en cada caso como producto seco:

flores de camomila (inflorescencia con cabeza de flor y flor)	4,00 kg
flores de rosa (Rosa damascena)	8,00 kg
flores de lavanda	1,20 kg
mirra (resina)	0,07 kg
hierba de junco (Juncus acutus)	3,00 kg
corteza de sauce	0,80 kg

25 con una mezcla acuosa de alcoholes que contiene al menos el 80 % de etanol y dilución del extracto alcohólico con agua hasta 200 litros y contenido en alcohol del 0,1 al 1,0 %.

5. Composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por que** se usa la composición en una dilución, preferentemente con agua, entre el 0,001 % y el 10 % (p/p), preferentemente entre el 0,01 % y el 1 % (p/p), y de manera especialmente preferente entre el 0,1 % y el 0,5 % (p/p).

30 6. Composición farmacéutica de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como profilaxis o lucha contra infecciones por Herpes labialis, Herpes genitalis o Herpes zoster.

35 7. Composición farmacéutica de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como profilaxis o lucha contra virus de la gripe (Influenza).

8. Composición farmacéutica de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como profilaxis o lucha contra enfermedades de resfriado, cuyos orígenes son de naturaleza vírica.

40 9. Composición farmacéutica de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como profilaxis o lucha contra infecciones por VIH.

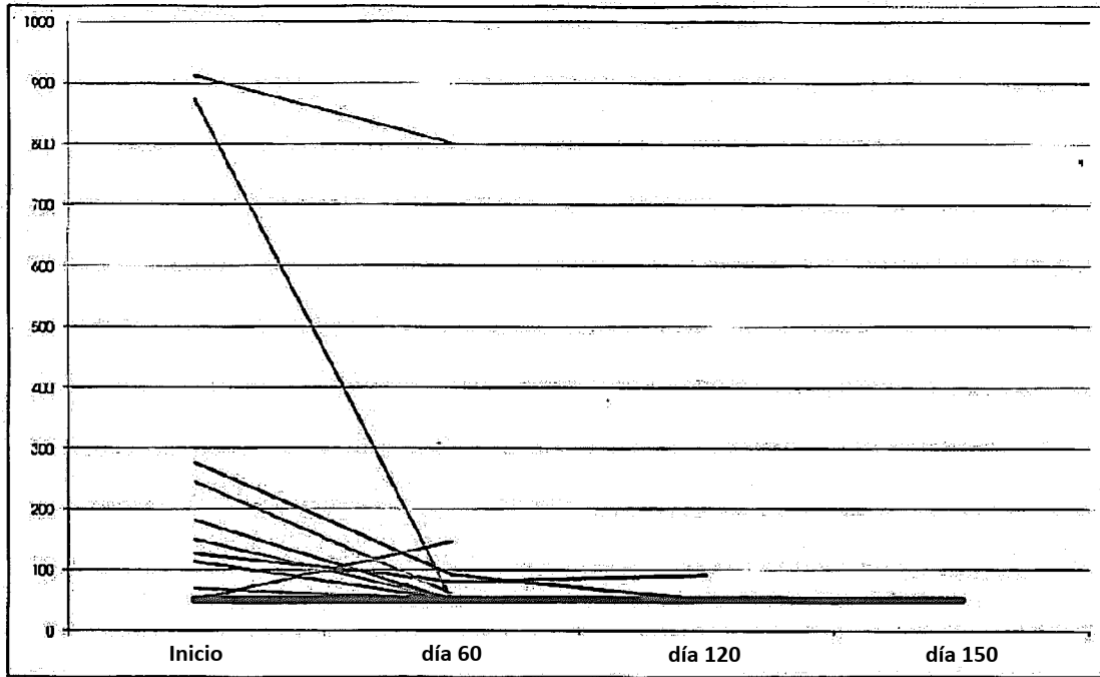


Tabla 1:

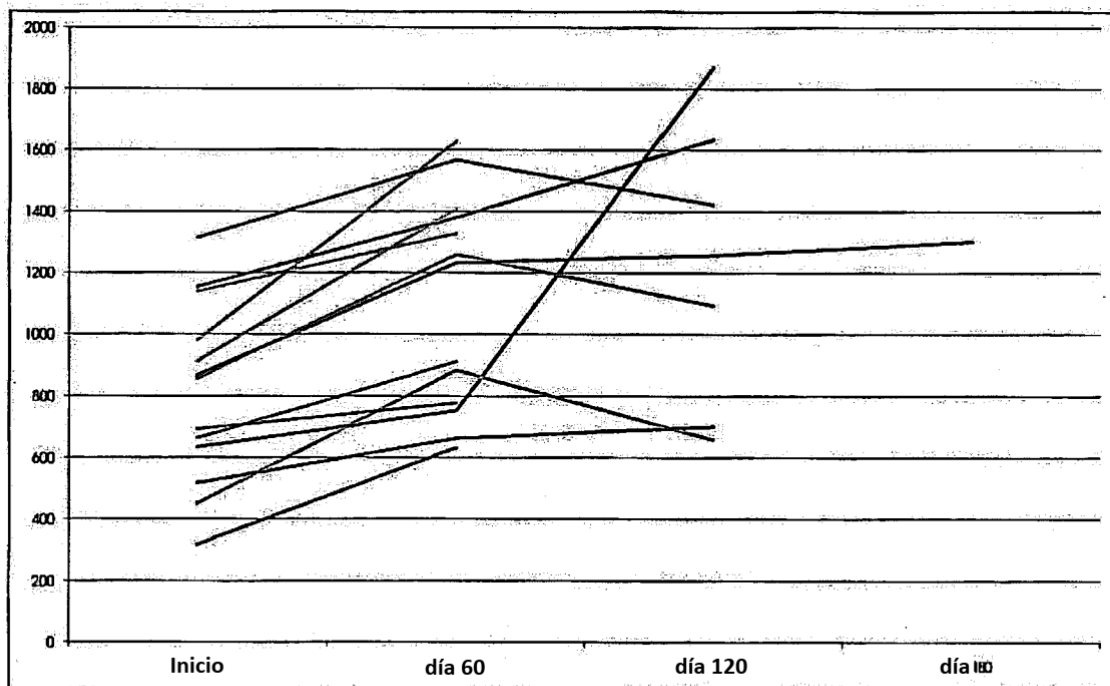


Tabla 2:

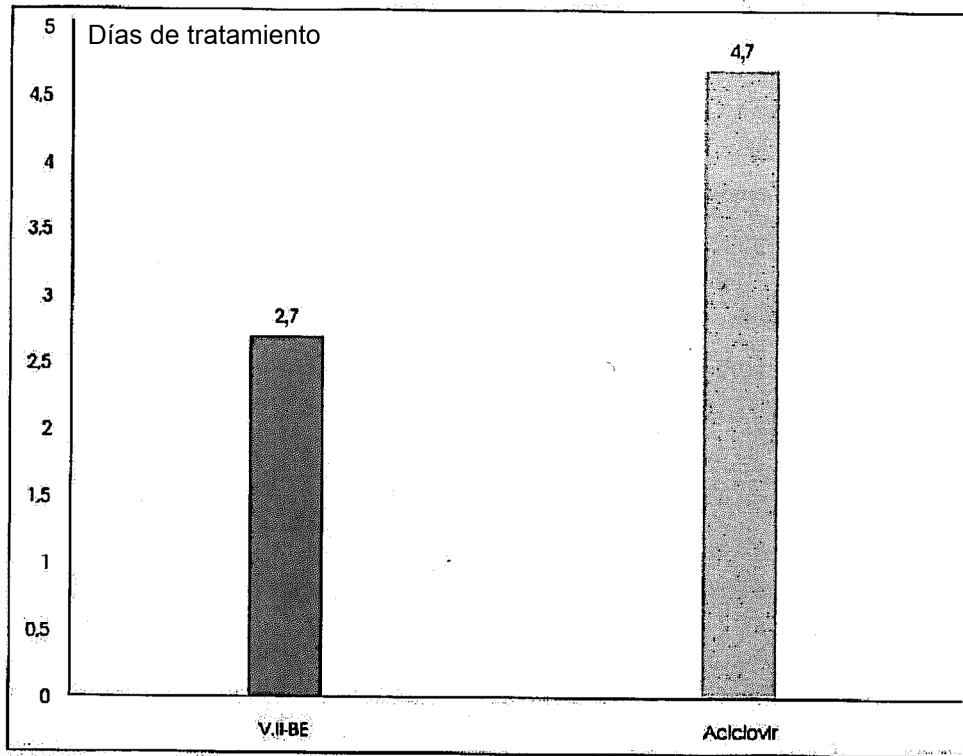


Tabla 3

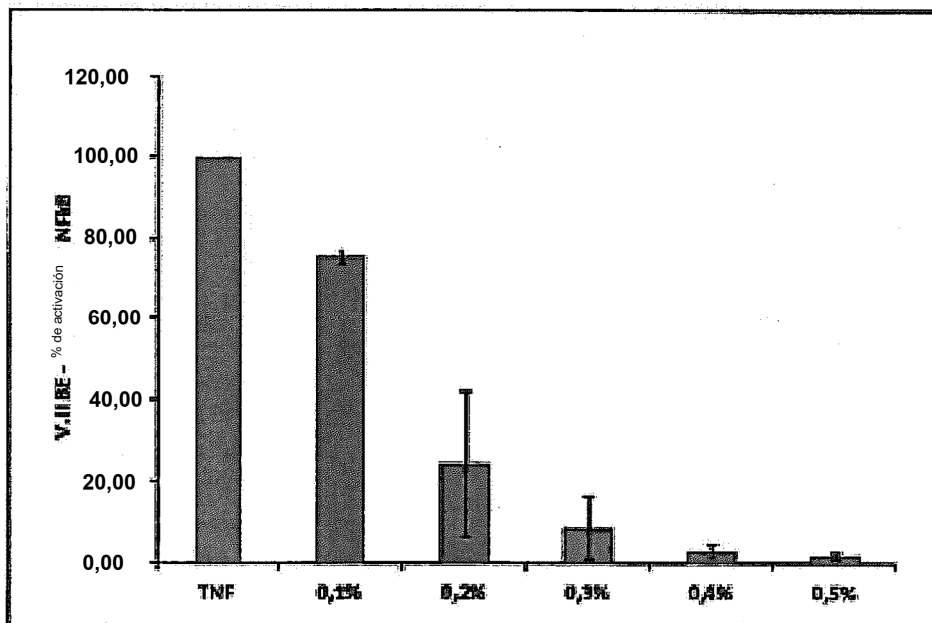


Tabla 4