

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de publicación internacional
WO 2019/234476 A1

(43) Fecha de publicación internacional
12 de diciembre de 2019 (12.12.2019) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación internacional de patentes:

A61K 36/12 (2006.01) A61P37/06 (2006.01)
A61P37/02 (2006.01)

TO, Marco Orlando; Avenida Arturo Prat 620, Departamento 402, Temuco (CL). **KURTE GOMEZ, Monica;** Avenida Hernán Cortes 2939, Departamento 4E, Ñuñoa, Santiago (CL).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/IB20 18/054 13 1

(74) **Mandatario: BELMAR, Cecilia;** Clarke, Modet & C° Chile, Huérfanos N°835, Piso 10, Santiago, 8320176 (CL).

(22) Fecha de presentación internacional:

07 de junio de 2018 (07.06.2018)

(81) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(71) **Solicitante: UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA** [CL/CL]; Avenida Francisco Salazar 0 1145, Temuco (CL).

(72) **Inventores: MONTIEL EULEFI, Enrique Erasmo;** Paje Raúl Sáez 270, Temuco (CL). **PAREDES HONORA-**

(54) **Title:** NATURAL BLECHNUM CHILENSE EXTRACT, WITH IMMUNOSUPPRESSIVE AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY FOR INHIBITING THE LYMPHOCYTE ACTIVATION ASSOCIATED WITH AUTO-IMMUNE AND INFLAMMATORY DISEASES AND THE REJECTION OF TISSUES IN TRANSPLANT PATIENTS

(54) **Título:** EXTRACTO NATURAL DE BLECHNUM CHILENSE, CON ACTIVIDAD INMUNOSUPRESORA Y ANTIINFLAMATORIA PARA INHIBIR LA ACTIVACIÓN LINFOCITARIA ASOCIADA A PATOLOGÍAS AUTOINMUNES, ANTIINFLAMATORIAS, Y EN EL RECHAZO DE TEJIDOS DE PACIENTES TRASPLANTADOS

(57) **Abstract:** In the treatment of auto-immune and inflammatory diseases, and for patients with organ transplants, immunosuppressive medicines such as corticosteroids and nonsteroidal anti-inflammatory drugs are used, however these have numerous adverse effects (hyperglycaemia, hypertension, muscle weakness, greater susceptibility to infections, osteoporosis, glaucoma, psychiatric disorders, stunted growth etc.) and outline the need to find new and improved immunosuppressive drugs which can be used, alone or in combination, in order to reduce the undesired effects. The inventors have discovered that the extract of the Chilean indigenous plant, *Blechnum chilense*, has anti-inflammatory and immunosuppressive effects and it is proposed that the bioactive molecules thereof with immunosuppressive activity will be useful for all those patients who need treatment with immunosuppressive drugs. Based on the analysis of the total extract of *Blechnum chilense* by means of LC-MS/MS and the presence of phenylpropane derivatives C₆-C₃ and C₆-C₃-C₆ and undetermined core terpenes, it has been determined that it has a potential immunomodulator effect like polidin, butanediol, limonene, 5 Cl-phenyl dimethyl and an antioxidant effect like gamma-glutamyl methionine. In addition, the results indicate that *Blechnum chilense* does not have a cytotoxic effect on CD3+ T lymphocytes, of both human and murine origins, which was determined by means of the analysis of the total extract in a dosage range of 0.1 µg/ml to 500 µg/ml, and that the median LD₅₀ and aqueous extracts in a dosage range of 10 µg/ml to 100 µg/ml demonstrate a clear inhibiting of lymphocyte proliferation, with CD3+ T lymphocytes of both human and murine origins not affecting the lymphocyte viability (see attached figures). In this way, the invention proposes a natural plant extract of *Blechnum chilense* containing bioactive secondary metabolites with immunosuppressive activity which inhibits the activation of T lymphocytes.

(57) **Resumen:** En el tratamiento de enfermedades autoinmunes y antiinflamatorias, y en pacientes con trasplante de órganos, se utilizan, medicamentos inmunosupresores como los corticosteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos, sin embargo, estos tienen numerosos efectos adversos (hiperglucemia, hipertensión, debilidad muscular, mayor susceptibilidad a infecciones, osteoporosis, glaucoma, trastornos psiquiátricos, detención del crecimiento entre otros) y plantean la necesidad de encontrar nuevos y mejores fármacos inmunosupresores, que se puedan utilizar, solos o en combinación, con el objetivo de reducir los efectos no deseados. En este sentido los inventores han encontrado que el extracto de la planta autóctona de Chile *Blechnum chilense*, cuenta con efectos antiinflamatorios e inmunosupresores y proponemos que sus moléculas bioactivas con actividad inmunosupresora serán útiles para todos aquellos pacientes que necesitan terapias con fármacos inmunosupresores. Los inventores han determinado, a partir del extracto total de *Blechnum chilense* mediante LC-MS/MS y la presencia de derivados



WO 2019/234476 A1

TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

— sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(H))

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

fenilpropánicos C₆-C₃ y C₆-C₃-C₆ y terpenos de núcleo indeterminado, que posee potencial efecto inmunomodulador tales como polidín butanodiol, limonin, 5Cl-feniltrimetil y antioxidante como gammaglutamilmietionina. También, los resultados indican que *Blechnum chilense* no presenta citotoxicidad sobre linfocitos T CD3⁺, tanto de origen humano como murino, lo que se determinó mediante análisis de extracto total en rango dosis respuesta 0,1 µg/ml a 500 µg/ml y que los extractos metanólicos y acuosos en rango dosis respuesta 10 µg/ml a 100 µg/ml muestran una clara inhibición de la proliferación de linfocitaria, linfocitos T, CD3⁺ tanto de origen humano como murino no afectando la viabilidad linfocitaria (ver figuras adjuntas). De este modo, la invención apunta a un extracto natural de la planta *Blechnum chilense* que contiene metabolitos secundarios bioactivos con actividad inmunosupresora que inhibe la activación de linfocitos T.

Extracto natural de *Blechnum chitense*, con actividad inmunosupresora y antiinflamatoria para inhibir la activación linfocitaria asociada a patologías autoinmunes, antiinflamatorias, y en el rechazo de tejidos de pacientes trasplantados

5

MEMORIA DESCRIPTIVA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención apunta a un extracto natural de *Blechnum chitense* con efecto
10 inmunosupresor y antiinflamatorio, para la profilaxis y tratamiento de patologías
antiinflamatorias, autoinmunes y en el rechazo de tejidos de pacientes trasplantados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los fármacos inmunosupresores y antiinflamatorios utilizados actualmente para el
15 tratamiento de numerosas patologías inflamatorias y autoinmunes, así como, también su
uso en pacientes trasplantados genera importantes efectos adversos. Más aún, su
utilización en padecimientos crónicos de larga data, multiplica el número de los efectos no
deseados, incluso a nivel sistémico. Por ejemplo, el uso de corticosteroides, el más
común de los fármacos antiinflamatorios, genera frecuentemente osteoporosis, aumento
20 del apetito, obesidad centrípeta, alteración de la cicatrización de heridas, aumento de
infecciones, supresión del eje hipotálamo-hipofisiario, detención del crecimiento normal en
niños, miopatía, osteonecrosis, hipertensión, plétora, piel frágil, estrías, púrpura, edema,
hiperlipidemia, síntomas psiquiátricos, euforia, diabetes mellitus y cataratas subcapsular
(Duru et al., 2013; Henneicke et al., 2014). Por otro lado, los anti-inflamatorios no
25 esteroidales o AINEs pueden producir trastornos gastrointestinales, alergias, retención de
líquido y disfunción plaquetaria entre otros efectos adversos (Duru et al., 2013). Durante la
última década, los protocolos inmunosupresores han utilizado una combinación de
fármacos para disminuir estos efectos adversos, sin perder efectividad. Los protocolos de
inmunosupresión actuales incluyen una combinación de inhibidores de la calcineurina,
30 como tacrolimus, y agentes antiproliferativos (micofenolato mofetilo), con o sin diferentes
regímenes de dosis de corticosteroides. Además, se incorporó la rapamicina, inhibidor de
mTOR para ser utilizado en combinación con ciclosporina, pero no ganó mucha
aceptación debido a su perfil de efectos adversos (Mühlbacher et al., 2013).

La desregulación del sistema inmune conduce a la inflamación crónica, la causa fundamental de todas las enfermedades crónicas no transmisibles. En este sentido, existe la necesidad de contar con nuevos fármacos de mayor eficiencia y con menos efectos secundarios. Es urgente mejorar las políticas y capacidades de los proveedores de salud (los gobiernos, las agencias internacionales y los aseguradores de salud), así como también de la industria farmacéutica e instituciones públicas y privadas para ofrecer nuevas y mejores alternativas para el tratamiento de estas patologías, inflamatorias, autoinmunes y pacientes trasplantados. Es un desafío de hoy repensar la forma en que aseguraremos una vida saludable mañana, con mejores estándares en la calidad de vida de una población que cada vez vive más años.

Las enfermedades crónicas, según la definición de la OMS, son enfermedades de larga duración y generalmente de progresión lenta. Las enfermedades crónico-inflamatorias y autoinmunes como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, enfermedad de Crohn entre otras, adquieren cada vez más relevancia debido al aumento en la expectativa de vida, al envejecimiento de la población, que genera numerosos pacientes que deben mantenerse bajo tratamiento antiinflamatorio y/o inmunosupresor por largos años aumentando los costos de tratamiento. Se espera que para el año 2020 las enfermedades inflamatorias crónicas sean la cuarta causa de discapacidad. Además, los estudios epidemiológicos sugieren que la inflamación crónica es un factor de riesgo importante para varios tipos de cáncer (Gautam y Jachak, 2009). Según el NIH (National Institute of Health), 23,5 millones de personas en USA, sufren enfermedades autoinmunes, sin embargo, la agencia AARDA (American Autoimmune Related Diseases Associations) estima que el número es significativamente mayor llegando a 50 millones, (www.aarda.org). La tasa de incidencia en USA de 1 por cada 31 individuos (Rose y Mackay 1998). En Chile, el número de personas registradas con patologías autoinmunes es cercano a las 500.000 con una tasa de incidencia similar a la descrita por AARDA en USA (Rose y Mackay 1998). Estas enfermedades generan problemas funcionales graves que deprimen el desarrollo físico, psicológico y social, deteriorando la calidad de vida de niños y adultos afectados, siendo la mayoría de estas patologías difíciles de revertir mediante el uso de los fármacos disponibles actualmente.

Lógicamente, el aumento de la expectativa de vida conllevará a un aumento en los gastos en salud. Hoy en día, las patologías asociadas a alteraciones del sistema inmunológico se encuentran dentro de las 20 áreas que más gastan en salud (Source: Royal Society Diseases Publishing). Tanto los individuos, como el estado deberán replantearse los
5 requerimientos para años venideros. Lo que sí es seguro, es la urgencia hoy en avanzar en investigación, desarrollo, actualizar las políticas y gestión en salud. Aumentar la capacidad de los proveedores de salud (los gobiernos, las agencias internacionales y los aseguradores de salud), así como también de la industria farmacéutica para ofrecer nuevas y mejores alternativas para el tratamiento de enfermedades asociadas una
10 población envejecida.

Hasta ahora no se habían reportado las propiedades inmunosupresoras de extractos de plantas de la especie *Blechnum chilense*. Plantas del género *Blechnum*, han sido usadas como ingredientes de composiciones farmacéuticas y cosmetológicas, en mezclas con
15 extractos de otras plantas, pero sin referencias a un efecto inmunosupresor.

En el estado de la técnica no existen protocolos o métodos de extracción específicos para la especie empleada en la invención. De acuerdo con lo cual, la invención no se deriva de forma natural ni obvia desde datos previos.
20

El extracto de la invención puede ser aplicado en la industria farmacéutica para obtener medicamentos útiles para tratar enfermedades inflamatorias/autoinmunes y en cualquier tratamiento donde sea requerida la inmunosupresión.

25 SOLUCIÓN AL PROBLEMA TÉCNICO

De este modo la invención provee una alternativa natural para obtener medicamentos útiles para tratar enfermedades inflamatorias/autoinmunes y en cualquier tratamiento donde sea requerida la inmunosupresión, que consiste en el extracto de *Blechnum chilense* de la invención.
30

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Experimento de viabilidad de cultivo de linfocitos extraídos de bazo de ratón, mediante ensayo de exclusión de yoduro de propidio. Las células (1×10^6 cel/mL) fueron incubadas en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino 10% y concavalina A (1pg/mL) y antibióticos 0,1 % (ampicilina, estreptomicina, anfotericina B) por 24, 48 y 72 horas en presencia de extracto de *B. chítense* sin filtrar y filtrado con membranas de 0,2 y 5 μ m de poro. Se evaluaron concentraciones de 0,001 a 10 pg/mL. La mortalidad se determinó por porcentaje de células que incorporaron yoduro de propidio. Encontrándose en general menos del 10% de mortalidad en todo el rango de concentraciones ensayadas. Segmento anterior de la figura (fotografías) se muestran el cultivo celular de linfocitos tratadas con 1pg/mL de extracto de *B. chítense* las 48 hrs.

Fig. 2. Ensayo de viabilidad de cultivo de linfocitos T CD3+, extraídos de bazo de ratón (Spleen; gráficos superior e inferior izquierdos) y de sangre periférica humana (PBMC; gráficos superior e inferior derechos), mediante ensayo de exclusión de yoduro de propidio. Los linfocitos T de bazo de ratón (1×10^6 cel/mL) fueron incubados en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino 10% y concavalina A (1pg/mL) y antibióticos 0,1 % (ampicilina, estreptomicina, anfotericina B) por 60 horas. Luego se evaluaron por separado dos réplicas del extracto de *B. chítense* (ExBL2 y ExBL2b), en concentraciones de 0,1 a 100 pg/mL incubando por 12 y 60 hrs. Los linfocitos T de sangre periférica se incubaron en el mismo medio descrito anteriormente reemplazando concavalina A por fitohemaglutinina (PHA) 15 pg/mL. La mortalidad linfocitaria, se evaluó por porcentaje de células que incorporaron yoduro de propidio. Encontrándose un rango de mortalidad similar al producido por el control (DMSO 0-100 pg/mL) y menor que el basal en linfocitos de ratón.

Fig. 3. Ensayo de citometría de flujo de linfocitos T CD3+, extraídos de bazo de ratón. Los dot-blot muestran el tamaño (FSC) y complejidad (SSC) y la selección de poblaciones (P1 a P4). Los linfocitos T de bazo de ratón (1×10^6 cel/mL) fueron incubados en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino 10% y concavalina A (1pg/mL) y antibióticos 0,1 % (ampicilina, estreptomicina, anfotericina B) por 60 horas. Luego se agregó extracto de *B. chítense* (ExBL2b), en concentraciones de 1 pg/mL, incubando por 12 hrs (gráficos superiores) y 60 hrs (gráficos inferiores). APC y PE muestran la proliferación y viabilidad celular.

Fig. 4. Histogramas derivados de análisis por citometría de flujo que representan proliferación de linfocitos T CD3+, de ratón incubados por 60 horas con extracto de *B. chítense* (EXBL2b) en concentraciones de (1, 10, 50, y 100 µg/mL pg/mL). Los linfocitos T de bazo de ratón (1×10^6 cel/mL) fueron incubados en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino 10% y concavalina A (1pg/mL) y antibióticos 0,1 % (ampicilina, estreptomycin, anfotericina B). Se observó que en concentraciones de 50 y 100 pg/mL del extracto se produce una evidente disminución de la proliferación de estas células.

Fig. 5. Perfil cromatográfico del extracto de *B. chítense* obtenido por UV-HPLC. Se muestra la frecuencia de moléculas según su absorbancia y su masa asociada al tiempo de retención (RT) en polaridad positiva (espectro +) y negativa (espectro -).

DESCRIPCION DE LA INVENCION

15

La invención se refiere a un extracto natural de *Blechnum chítense*, con efecto inmunosupresor y antiinflamatorio, útil para la profilaxis y tratamiento de patologías antiinflamatorias, autoinmunes y en el rechazo de tejidos de pacientes trasplantados. Los inventores han encontrado que el extracto de *Blechnum chítense*, reduce significativamente la proliferación de linfocitos T humanos y murinos, sin afectar su viabilidad (ver ejemplos). La actividad biológica encontrada en el extracto de la invención, permite plantear sus posibles aplicaciones farmacológicas en el tratamiento de diferentes patologías tales como: lupus eritematoso, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedades inflamatorias intestinales, así como, en terapia inmunosupresora dirigida a pacientes con trasplante de órganos, donde la desregulación de linfocitos T es el punto clave.

25

Los extractos de *B. chítense* de la invención se preparan macerando material vegetal seco pulverizado en metanol puro durante seis días, con agitación constante y en oscuridad. El extracto obtenido se concentra en un rotavapor bajo presión reducida a 30° C, obteniéndose un residuo de color marrón oscuro, que posteriormente es resuspendido en agua destilada. Luego se desgrasa por extracción líquido-líquido con n-hexano. La fracción de n-hexano se desecha y la fracción acuosa se concentra a sequedad en un

30

evaporador rotatorio con presión reducida a 30° C. El residuo concentrado se disuelve en agua destilada a 35° C y posteriormente se liofiliza obteniéndose un material pulverizado.

5 La invención proporciona un extracto de la planta de la especie *Blechnum chítense*, y en especial de su raíz, el que tiene actividad inmunosupresora sobre linfocitos T humanos. Los inventores han encontrado que la planta autóctona de Chile *Blechnum chítense*, cuenta con efectos antiinflamatorios e inmunosupresores y proponemos que sus moléculas bioactivas con actividad inmunosupresoras y antiinflamatorias serán útiles para todos aquellos pacientes que necesitan terapias con fármacos inmunosupresores y/o
10 antiinflamatorios.

De este modo, en un primer aspecto la invención apunta a un extracto de la planta *Blechnum chítense* con propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias que contiene metabolitos secundarios bioactivos que inhiben la activación de linfocitos. Donde este
15 extracto se obtiene macerando material vegetal seco pulverizado de *B. chítense* en metanol puro. Y donde los metabolitos secundarios bioactivos son polidín, butanodiol, limonin, 5CI-feniltrimetilsilano, alfa-galocatequina quinona A y gammaglutamilmetionina.

En un segundo aspecto la invención se refiere al uso del extracto para preparar un
20 medicamento con actividad inmunosupresora y antiinflamatoria, donde el medicamento comprende el extracto de la invención y excipientes y auxiliares de formulación para distintas formas farmacéuticas, como jarabes, grageas, comprimidos, solución inyectable, colirio, cremas o ungüentos.

25 De este modo el extracto de la invención permite obtener o preparar un medicamento útil para prevenir y tratar enfermedades autoinmunes tales como lupus eritematoso, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades inflamatorias intestinales. En un aspecto adicional el extracto de la invención permite obtener o preparar un medicamento útil para terapia inmunosupresora
30 en caso de trasplante de órganos, en el cuerpo humano o animal. Adicionalmente, el extracto de la invención permite obtener o preparar un medicamento útil para reducir la proliferación de linfocitos T, *in vivo* o *in vitro*.

Los inventores han determinado, a partir del extracto total de *Blechnum chítense* mediante análisis HPLC-MS/MS, la presencia de derivados fenilpropánicos C6-C3 y C6-C3-C6 y terpenos de núcleo indeterminado, que el extracto posee potencial inmunomodulador. También, los resultados indican que *Blechnum chítense* no presenta citotoxicidad sobre

5 linfocitos T CD3+, tanto de origen humano como murino, lo que se determinó mediante análisis de extracto total en rango dosis respuesta 0,1ug/ml a 500 ug/ml y que los extractos metanólicos y acuosos en rango dosis respuesta 10 ug/ml a 100 ug/ml muestran una clara inhibición de la proliferación de linfocitaria, linfocitos T, CD3+ tanto de origen humano como murino no afectando la viabilidad linfocitaria (ver ejemplos). En este

10 sentido la inhibición de la proliferación de linfocitos T CD3+ in vivo por efecto del extracto se presenta como un mecanismo inmunosupresor de respuestas de rechazo inmunológico y de procesos inflamatorios con potencial terapéutico.

De este modo, la invención apunta a un extracto natural de la planta *Blechnum chítense*

15 que contiene metabolitos secundarios bioactivos con actividad inmunosupresora que inhibe la proliferación de linfocitos T, el cual se ha determinado que está enriquecido en los compuestos inmunomoduladores y antiinflamatorios: polidin (+m/z:341 ,20/RT :20,7±0, 1), butanodiol (+m/z:327,2/RT:20,7±0,1), limonin (-m/z:515,30/RT:21 ,397±0,1), 5CI-feniltrimetilsilano o flavonoides como: alfa-galocatequina

20 (+m/z:899,20/RT:20,7±0,1) o quinona A (-m/z:515,30/RT:21,397±0,1) y antioxidante como gammaglutamilmetionina (+m/z:279, 10/RT :20,7±0, 1).

EJEMPLOS DE APLICACIÓN

25 EJEMPLO 1. Obtención del extracto.

Se maceró 100 g de material vegetal seco pulverizado en 500 mL de metanol puro durante seis días, con agitación constante y en oscuridad. El extracto obtenido se concentró en un rotavapor bajo presión reducida a 30° C, obteniéndose 2 g de residuo de color marrón oscuro, que posteriormente se resuspendió en 50 ml de agua destilada.

30 Luego el residuo se desgrasó por extracción líquido-líquido con 50 mL de n-hexano. La fracción de n-hexano se desechó y la fracción acuosa se concentró a sequedad en un evaporador rotatorio con presión reducida a 30° C. Posteriormente el residuo concentrado se disolvió en 50 mL agua destilada a 35° C y finalmente se liofilizó obteniéndose 5 g de

material seco pulverizado. Se obtuvo un rendimiento promedio del 5 % de extracto seco respecto a la masa de hojas secas extraídas. La solubilidad en agua del extracto seco se determinó en 1,5 mg/ ml. El pH de la solución fue de 6,1 a 25 °C. Los sólidos totales soluble se determinaron en 1,0 ml solución evaporada a 103 °C a sequedad y enfriados en desecador con sílica hasta peso contante de la cápsula, determinándose en 1,10 g/mL.

EJEMPLO 2. Ensayo de viabilidad de cultivo de linfocitos T CD3+.

Con el objetivo de evaluar el efecto citotóxico del extracto sobre linfocitos T CD3+ se realizó un ensayo *in vitro* utilizando linfocitos aislados de bazo de ratón, mediante ensayo de exclusión de yoduro de propidio.

En primer lugar, linfocitos CD3+ T (1×10^6 cel/mL), extraídos de bazo de ratón, fueron incubados en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino 10%, el inductor de mitosis concavalina A (1pg/mL) y antibióticos 0,1 % (ampicilina, estreptomycin, anfotericina B), en presencia de extractos de *B. chítense*, en concentraciones de 0,001 a 10 µg/mL por 24, 48 y 72 hrs. Donde el extracto de *B. chítense* se obtuvo resuspendiendo el material seco liofilizado, obtenido en el ejemplo 1, a las concentraciones evaluadas. El extracto resuspendido se filtró con membranas de 0,2 y 5 µm de poro, antes de su utilización. La mortalidad se determinó por porcentaje de células que incorporaron yoduro de propidio. Los resultados se muestran en la figura 1. En todas las condiciones evaluadas hubo una mortalidad de menos del 10 % de los linfocitos en cultivo. Los mejores resultados se obtienen con el extracto filtrado con poro 0,2 µm, aunque la diferencia entre las distintas condiciones es mínima. A las 72 horas, en todas las condiciones de filtrado evaluadas y en todas las concentraciones, la mortalidad celular es similar al control (0% extracto).

En un segundo ensayo se evaluó si el extracto de la invención afecta la viabilidad de cultivo de linfocitos T CD3+ extraídos de bazo de ratón (Spleen) y linfocitos T CD3+ de sangre periférica humana (PBMC) en presencia de extracto de *B. chítense*, en concentraciones de 0,1 a 100 pg/mL por 12 y 60 hrs.

Los linfocitos CD3+ T (1×10^6 cel/mL) fueron incubados en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino 10%, el inductor de mitosis concavalina A (1 pg/mL) y antibióticos 0,1 % (ampicilina, estreptomina, anfotericina B), en presencia de extracto de *B. chítense*, en concentraciones de 0,1 a 100 $\mu\text{g/mL}$ por 12 y 60 hrs. Los linfocitos T de

5 sangre periférica se incubaron en el mismo medio descrito anteriormente reemplazando concavalina A por el inductor de mitosis fitohemaglutinina (PHA) 15 pg/mL. La mortalidad se evaluó por porcentaje de células que incorporaron yoduro de propidio. Los resultados se muestran en la Figura 2.

10 Encontrándose un rango de mortalidad similar al producido por el control (DMSO 0-100 pg/mL) y menor que el basal en linfocitos de ratón. Este ejemplo permite concluir que en el rango de concentración utilizado no se observó citotoxicidad diferente al nivel el control sin tratamiento.

15 EJEMPLO 3. Ensayo de citometría de flujo de linfocitos T CD3+.

El objetivo de este ensayo fue valorar el efecto proliferativo y de viabilidad celular del extracto en poblaciones aisladas de linfocitos T CD3+ obtenidos de bazo de ratón.

Los dot-blot muestran el tamaño (FSC) y complejidad (SSC) y la selección de poblaciones

20 de linfocitos T incubados en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino 10% y concavalina A (1pg/mL) y antibióticos 0,1 % (ampicilina, estreptomina, anfotericina B) por 60 horas en presencia de extracto de *B. chítense*, en concentraciones de 1pg/mL por 12h (gráfico superior) y 60h (gráfico inferior). Los marcadores fluorescentes alo-ficocianina (APC) y ficoeritrina (PE) muestran la proliferación y viabilidad celular de linfocitos T CD3+.

25 Los resultados se muestran en la Figura 3. Se concluye que el extracto en las concentraciones utilizadas posee un efecto antiproliferativo en cultivos celulares estimulados con el compuesto mitogénico concavalina A.

EJEMPLO 4. Ensayo de citometría de flujo para evaluar proliferación de linfocitos

30 T CD3+, de ratón incubados en con extracto de *B. chítense*, en cuatro concentraciones (1, 10, 50, y 100 pg/mL). El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de un rango de concentraciones del extracto (1 a 100 pg/mL), sobre proliferación de estas células. Los resultados se muestran en la Figura 4. Se observó que en concentraciones de 50 y 100

µg/mL del extracto se produce una evidente disminución del número de poblaciones celulares de linfocitos T CD3+ diferentes estadios de proliferación (en la figura: menor número de curvas). Se concluye que concentraciones de 50 y 100 pg/mL se genera una significativa inhibición de la proliferación celular en cultivos tratados con extracto de *B. chilense*.

EJEMPLO 5. Perfil cromatográfico por UV- HPLC del extracto de *Blechnum chitense*.

El objetivo de este ensayo fue caracterizar molecularmente el extracto. Para ello, se realizó un análisis mediante cromatografía líquida de alta eficacia de espectro ultra visible UV- HPLC y espectrometría de masa-masa (MS/MS) para identificar metabolitos con actividad inmunológica. En la figura 5 se muestran la frecuencia de moléculas según su absorbancia y su masa asociada al tiempo de retención (RT) en polaridad positiva (+) y negativa (-). El análisis del perfil cromatográfico permitió detectar metabolitos secundarios bioactivos con actividad inmunosupresora que inhibe la activación de linfocitos T, el cual se ha determinado que está enriquecido en los compuestos inmunomoduladores y antiinflamatorios: polidín (+m/z:341,20/RT:20,7±0,1), butanodiol (+m/z:327,2/RT:20,7±0,1), limonin (-m/z:515,30/RT:21,397±0,1), 5CI-feniltrimetilsilano o flavonoides como: alfa-galocatequina (+m/z:899,20/RT:20,7±0,1) o quinona A (-m/z:515,30/RT:21,397±0,1) y antioxidante como gammaglutamilmetionina (+m/z:279,10/RT:20,7±0,1).

En otra realización de la invención, el extracto de obtenido en el ejemplo 1 puede estar comprendido en una composición farmacéutica, la cual además comprende excipientes, auxiliares o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Dicha composición farmacéutica puede estar formulada en forma de jarabes, grageas, comprimidos, solución inyectable, colirio, cremas o ungüentos.

Para el experto en la técnica será evidente que los excipientes, auxiliares o vehículos farmacéuticamente aceptables de formulación dependen del método de aplicación que se aplique.

EJEMPLO 6. Composición farmacéutica.

Se preparó un jarabe para administración farmacéutica con la siguiente composición:

Extracto obtenido en el ejemplo 1 a una concentración de 500 µg/mL en agua destilada, 800 mL, sacarosa al 65% 100 mL, benzoato sódico 1g, agua purificada c.s.p. 1000 mL.

5

Esta composición puede administrarse oralmente, y obtenerse el efecto inmunosupresor y antiinflamatorio de la invención al inhibir la proliferación de linfocitos.

REIVINDICACIONES

- 1.- Extracto vegetal con propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias, CARACTERIZADO porque es un extracto de *Blechnum chitense* con metabolitos secundarios bioactivos que inhiben la proliferación de linfocitos.
5
- 2.- Extracto vegetal de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque se obtiene macerando material vegetal seco de *B. chitense* pulverizado en metanol puro.
- 10 3.- Extracto vegetal de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque contiene polidín, butanodiol, limonin, 5Cl-feniltrimetilsilano, alfa-galocatequina quinona A y gammaglutamilmetionina.
- 15 4.- Composición farmacéutica, CARACTERIZADA porque comprende el extracto de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, y excipientes y auxiliares farmacéuticamente aceptables.
- 20 5.- La composición farmacéutica de la reivindicación 4, CARACTERIZADA porque la composición se encuentra en forma de jarabes, grageas, comprimidos, solución inyectable, colirio, cremas o ungüentos.
- 25 6.- La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, CARACTERIZADA porque la composición se encuentra preferentemente en forma de jarabe y comprende excipientes farmacéuticamente aceptables tales como sacarosa y benzoato sódico.
- 6.- Uso de un extracto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, CARACTERIZADO porque sirve para preparar un medicamento.
- 30 7.- Uso de un extracto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, CARACTERIZADO porque sirve para preparar un medicamento útil para prevenir y tratar enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

8.- El uso de acuerdo con la reivindicación 7, CARACTERIZADO porque dichas enfermedades autoinmunes son tales como lupus eritematoso, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades inflamatorias intestinales.

5

9.- Uso de un extracto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, CARACTERIZADO porque sirve para preparar un medicamento útil para terapia inmunosupresora en caso de trasplante de órganos.

10 10.- Uso de un extracto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, CARACTERIZADO porque sirve para preparar un medicamento útil para reducir la proliferación de linfocitos T.

Figura 1.-

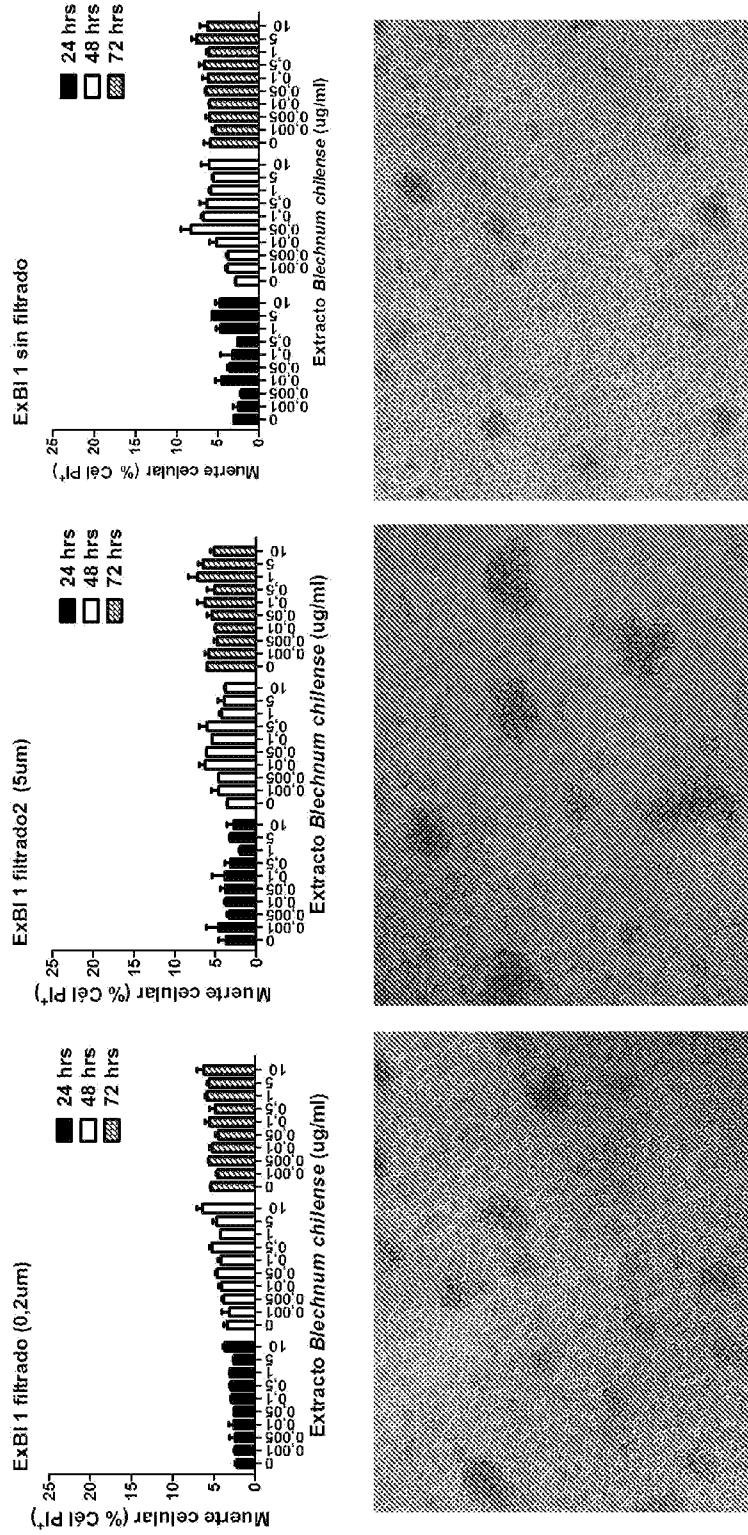


Figura 2.-

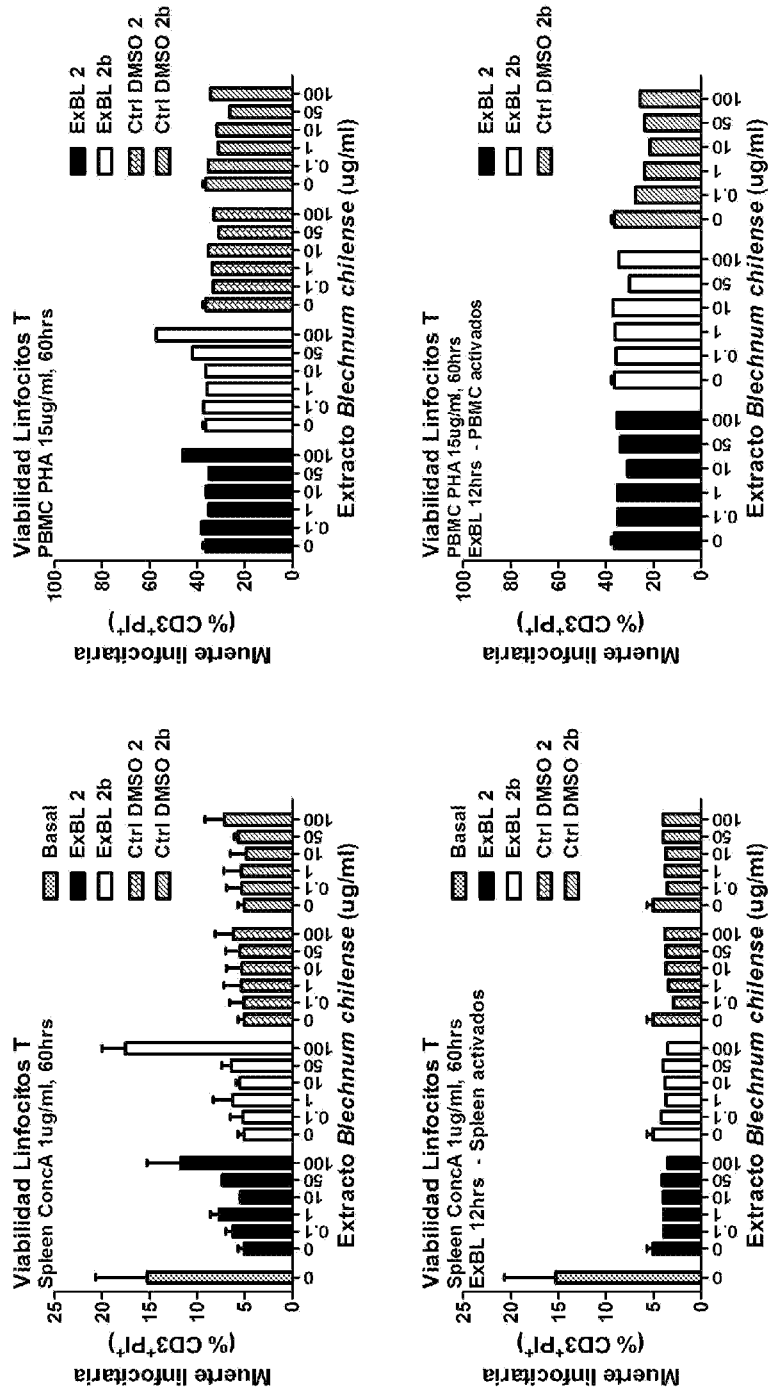


Figura 3.-

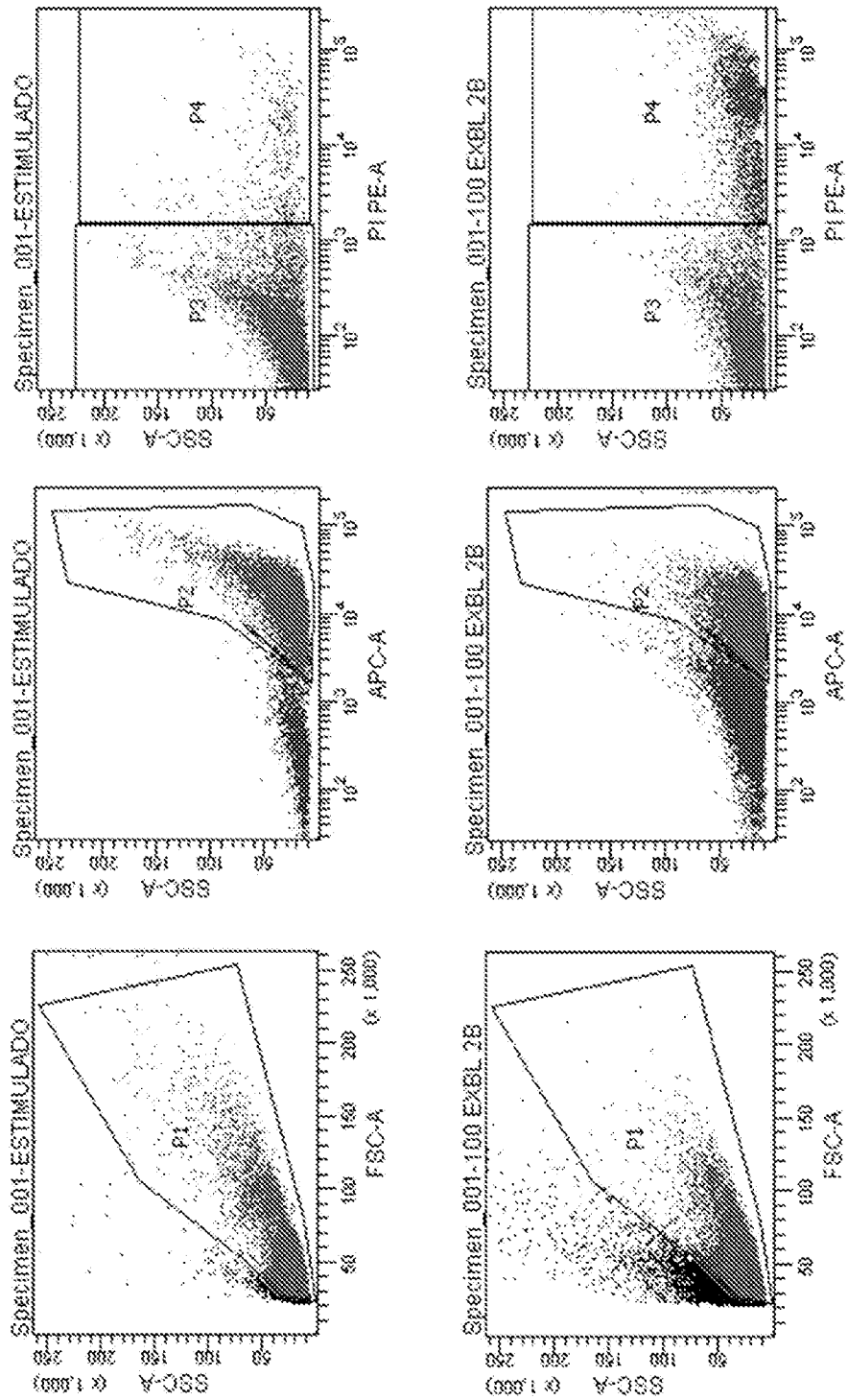


Figura 4.-

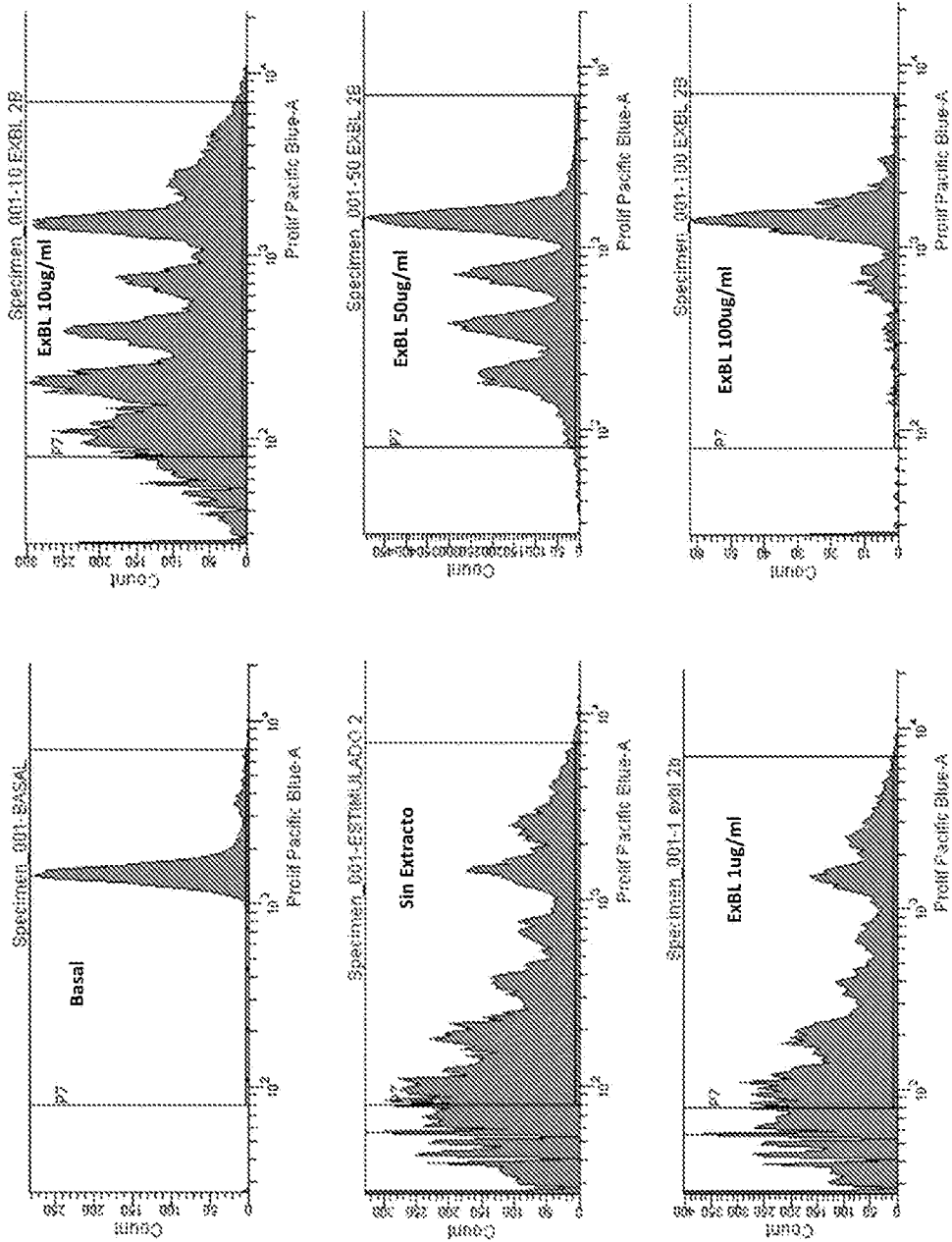
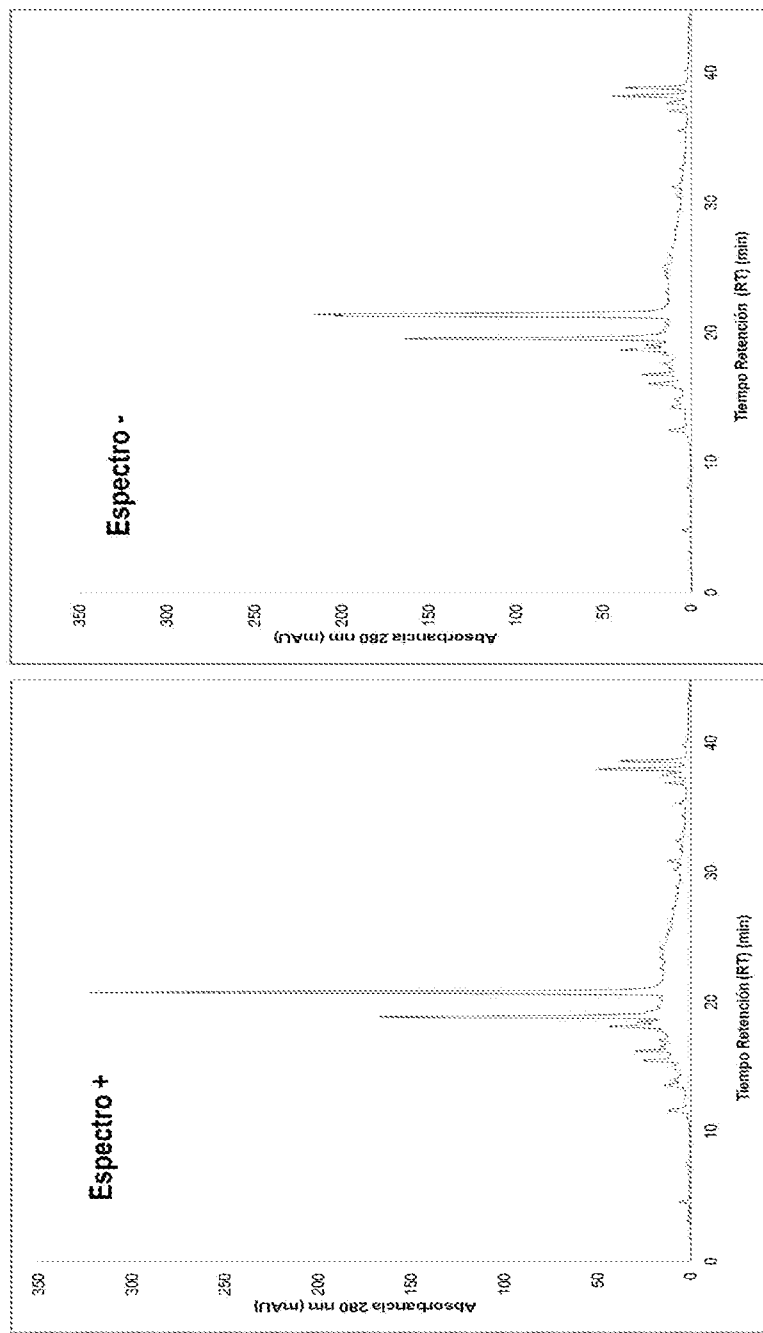


Figura 5.-



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2018/054131

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K36/12, A61P37/02, A61P37/06 (2019.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) (CIP): A61K36/12, A61P37/02, A61P37/06		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN, GOOGLE SCHOLAR, GOOGLE PATENTS, BEIC, INAPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	FALKENBERG, S. S. et al. Mapuche herbal medicine inhibits blood platelet aggregation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012, vol. 2012. Article ID 647620 DOI: 10.1155/2012/647620 The whole document	1-7 8-11
X Y	MØLGAARD, P. et al. Antimicrobial evaluation of Huilliche plant medicine used to treat wounds. Journal of ethnopharmacology, 2011, vol. 138, no 1, p. 219-227. DOI: 10.1016/j.jep.2011.09.006 The whole document	1-7 8-11
X Y	HINCAPIÉ, C. et al. Antioxidant activity of Blechnum chilense (Kauf.) Mett., Curcuma domestica Valetton and Tagetes verticillata Lag. & Rodriguez. Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas, 2011, vol. 10, no 4. p. 315-324 Retrieved on [15-01-2019] Retrieved from internet: <http://www.revistas.usach.cl/ojs/index.php/blacpma/article/view/266/262> The whole document	1-7 8-11
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 15 January 2019 (15.01.2019)	Date of mailing of the international search report 06 February 2019 (06.02.2019)	
Name and mailing address of the ISA/ INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago, Chile Facsimile No.	Authorized officer NARVAEZ HURTADO, Claudio Telephone No. 56-2-28870551	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB201 8/0541 31

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>NONATO, F. R. et al. Antiinflammatory and antinociceptive activities of <i>Blechnum occidentale</i> L. extract. <i>Journal of ethnopharmacology</i>, 2009, vol. 125, no 1, p. 102-107. DOI: 10.1016/j.jep.2009.06.005 The whole document</p>	8-11
Y	<p>YASIN, H. et al. Immunomodulators from plant source: A review. 2015. <i>World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences</i>. Volume 4 (8), pag. 21-36. Retrieved on [14-01-2019] Retrieved from internet: <https://www.researchgate.net/profile/Dr_Fakhsheena_Anjum/publication/280609002_IMMUNOMODULATORS_FROM_PLANT_SOURCE_A_REVIEW/links/55bdea6308ae092e96639ab6.pdf> The whole document</p>	8-11
Y	<p>GULATI, K. et al. Immunomodulatory Indian medicinal plants. <i>Journal of natural remedies</i>, 2002, vol. 2, no 2, p. 121-131. DOI: 10.18311/jnr/2002/142 The whole document</p>	8-11

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB2018/054131

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

(CIP): A61K36/12, A61P37/02, A61P37/06 (2019.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

(CIP): A61K36/12, A61P37/02, A61P37/06

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) **STN, GOOGLE SCHOLAR, GOOGLE PATENTS, BEIC, INAPI**

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X Y	FALKENBERG, S. S. et al. Mapuche herbal medicine inhibits blood platelet aggregation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012, vol. 2012. Article ID 647620 DOI: 10.1155/2012/647620 Todo el documento	1-7 8-11
X Y	MØLGAARD, P. et al. Antimicrobial evaluation of Huilliche plant medicine used to treat wounds. Journal of ethnopharmacology, 2011, vol. 138, no 1, p. 219-227. DOI: 10.1016/j.jep.2011.09.006 Todo el documento	1-7 8-11
X Y	HINCAPIÉ, C. et al. Antioxidant activity of Blechnum chilense (Kaulf.) Mett., Curcuma domestica Valetton and Tagetes verticillata Lag. & Rodriguez. Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas, 2011, vol. 10, no 4. p. 315-324 [Recuperado el 15-01-2019] Recuperado de internet: < http://www.revistas.usach.cl/ojs/index.php/blacpma/article/view/266/262 > Todo el documento	1-7 8-11

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	
“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	
“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 15/01/2019	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 06/02/2019 06/febrero/2019
--	--

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago, Chile	Funcionario autorizado NARVAEZ HURTADO, Claudio
---	---

N° de fax	N° de teléfono 56-2-28870551
-----------	-------------------------------------

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB2018/054131

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	<p>NONATO, F. R. et al. Antiinflammatory and antinociceptive activities of <i>Blechnum occidentale</i> L. extract. <i>Journal of ethnopharmacology</i>, 2009, vol. 125, no 1, p. 102-107. DOI: 10.1016/j.jep.2009.06.005 Todo el documento</p>	8-11
Y	<p>YASIN, H. et al. Immunomodulators from plant source: A review. 2015. <i>World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences</i>. Volumen 4 (8), pag. 21-36. [Recuperado el 14-01-2019] Recuperado de internet: <https://www.researchgate.net/profile/Dr_Fakhsheena_Anjum/publication/280609002_IMMUNOMODULATORS_FROM_PLANT_SOURCE_A_REVIEW/links/55bdea6308ae092e96639ab6.pdf> Todo el documento</p>	8-11
Y	<p>GULATI, K. et al. Immunomodulatory Indian medicinal plants. <i>Journal of natural remedies</i>, 2002, vol. 2, no 2, p. 121-131. DOI: 10.18311/jnr/2002/142 Todo el documento</p>	8-11