



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 390**

51 Int. Cl.:
A61K 36/185 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06792038 .9**
96 Fecha de presentación : **13.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1924272**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.05.2008**

54 Título: **Uso de extractos de *Cistus incanus* para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la gripe.**

30 Prioridad: **13.09.2005 EP 05019934**
24.03.2006 US 785603 P

73 Titular/es: **Georgios Pandalis**
Füchtenweg 3
49219 Glandorf, DE

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.05.2011

72 Inventor/es: **Pandalis, Georgios**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.05.2011

74 Agente: **Miltenyi Null, Peter**

ES 2 358 390 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

Uso de extractos de *Cistus incanus* para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la gripe.

5 La presente invención se refiere al uso de un extracto para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la gripe, así como a un comprimido y a un aerosol que contienen el extracto.

Influenza, también conocida como gripe, es una enfermedad viral contagiosa que se propaga por todo el mundo en epidemias estacionales. Pueden distinguirse tres tipos de virus, A, B y C. Los tipos B y C están restringidos a seres humanos, mientras que el tipo A se extiende a mamíferos y aves.

10 La Organización Mundial de la Salud, OMS, advierte de una pandemia global de gripe en los próximos años. Las epidemias y las pandemias se producen principalmente por virus de la gripe de tipo A. Cambios genéticos principales del material genético de los virus de la gripe han producido tres pandemias en el siglo XX, cuyos agentes infecciosos fueron todos ellos del tipo A.

15 En la actualidad, la gripe aviar, también un virus de tipo A, representa un peligro particular de pandemia. Se ha producido cada vez más en los últimos años, particularmente en el sudeste asiático. Su propagación se produce a través de aves salvajes, que sirven como portadores resistentes de la enfermedad. Los expertos temen que el virus de la gripe aviar pueda cruzarse con un agente infeccioso de la gripe humana. En principio, esto es posible si cerdos o seres humanos se infectan simultáneamente con la gripe aviar y un agente infeccioso de la gripe humana. Esto podría conducir a un virus que es altamente contagioso y mortal para los seres humanos, lo que podría dar como resultado una pandemia global. Hasta ahora, la transmisión de la gripe aviar a seres humanos sólo ha tenido lugar localmente. Sin embargo, no se ha observado transmisión de la gripe aviar entre seres humanos.

20 La vacunación representa el medio más importante de prevenir una enfermedad viral. Sin embargo, en el contexto de la prevención, la vacunación depende de la preparación de una vacuna contra un virus determinado. Esto requiere que el virus ya debe existir. Esto, y el largo tiempo necesario para el desarrollo de una vacuna (aproximadamente 4 meses), conducen a una restricción sustancial en su uso en una pandemia global. En tal caso, el uso de vacunas sólo está garantizado por el uso anterior y simultáneo de agentes antivirales Directrices de la OMS sobre el uso de vacunas y agentes antivirales durante pandemias de gripe); Organización Mundial de la Salud 2004).

25 Los agentes antivirales que son eficaces en el tratamiento de la gripe incluyen amantadina, rimantadina, zanamivir, oseltamivir y ribavirina. Todos los medicamentos indicados tienen efectos secundarios que en algunos casos pueden ser graves. Por ejemplo, oseltamivir, que se vende con el nombre de Tamiflu[®], muestra los efectos secundarios frecuentes de náuseas, vómitos y dolor de estómago. Su uso está indicado sólo a partir de los 13 años de edad, ya que en algunos casos se observaron efectos secundarios graves tales como infecciones de oído, neumonías, infecciones de los senos nasales, bronquitis, hinchazón de los ganglios linfáticos y conjuntivitis (Lista roja, Catálogo de medicamentos para Alemania, 2004) en jóvenes menores del límite de edad.

30 Los medicamentos antivirales son eficaces en la profilaxis de una enfermedad viral, así como en su tratamiento. Hasta ahora no se ha tenido éxito en una cura médica directa de una enfermedad viral.

Además, se conoce el extracto de saúco por su efecto en acortar la duración de la gripe en algunas circunstancias, sin demostrar, sin embargo, ningún efecto preventivo apreciable (Zakay-Rones, Z.; Varsano, N.; Zlotnik, M.; Manor, O.; Regev, L.; Schlesinger, M.; Mumcuoglu, M. J. Altern. Complement. Med. 1995, 1 (4), 361-9).

35 También se conoce un efecto germicida en extractos procedentes de plantas del género *Cistus*. La especie *incanus* de *Cistus* y su subespecie *tauricus*, que son ambas prevalentes en la región mediterránea, ya se han usado en la medicina tradicional de esta región. *Cistus incanus* se usa en la cría de ganado como un remedio natural así como en general para mejorar el estado de salud de los animales (Pieroni, A.; Howard, P.; Volpato, G.; Santoro, R. F. Vet. Res. Commun. 2004, 28 (1), 55-80). En zonas del norte de Grecia, *Cistus incanus ssp. tauricus* se usó tradicionalmente para el tratamiento de enfermedades cutáneas (Petereit F., Kolodziej H., Nahrstedt A. Phytochemistry 1991, 30 (3), 981-985).

40 Las especies de *Cistus* contienen, entre otras cosas, flavanoides y proantocianidinas (Petereit F., Kolodziej H., Nahrstedt A. Phytochemistry 1991, 30 (3), 981-985), que pueden servir como antioxidantes en el organismo (Attaguile, G.; Russo, A.; Campisi, A.; Savoca, F.; Acquaviva, R.; Ragusa, N.; Vanella, A. Cell Biol Toxicol. 2000, 16 (2), 83-90). Los extractos de las hojas de *Cistus incanus* tienen actividad antibacteriana y antifúngica (Bouamama, H. et al. Therapie 1999, 54 (6), 731-3).

45 Como medida preventiva para el caso de una pandemia inminente que podría producirse por la gripe aviar, los países de la comunidad mundial confían en medicamentos antivirales. Por ejemplo, algunos países encargaron el medicamento oseltamivir mencionado anteriormente (Tamiflu[®]; Hoffman La Roche) en cantidades significativas como reserva para el caso de una pandemia, aunque se teme que el medicamento podría agotarse rápidamente en una emergencia. Además, la inmensa demanda ha conducido a cuellos de botella en la producción.

Además, el uso de los agentes antivirales (conocidos) pelagra cada vez más por el hecho de que se usan como medicamentos de amplio espectro en la cría de animales. Independientemente de las prohibiciones internacionales, tales prácticas han conducido por ejemplo en China a la resistencia de algunas cepas de la gripe aviar a estos agentes. Además de esto, están los efectos secundarios frecuentes de estos agentes que en algunos casos pueden ser graves. Además, en algunos casos estos medicamentos sólo están indicados para ciertos grupos de edad, tales como por ejemplo oseltamivir (Tamiflu®), que sólo puede usarse a partir de los 13 años de edad.

Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar un medicamento antiviral para la profilaxis y/o el tratamiento de la gripe, que pueda prepararse de manera económica y que no desencadene ningún efecto secundario en su administración.

Este objeto se logra mediante el uso de un extracto procedente de plantas del género *Cistus* para la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de la gripe, en el que el extracto se obtiene a partir de *Cistus incanus*. En las reivindicaciones dependientes 2 a 7 se exponen realizaciones adicionales de la invención.

Se conocen 20 tipos del género *Cistus*:

C. albidus L.

C. chinamadensis Banares & P. Romero

C. clusii Dunal

C. crispus L.

C. heterophyllus Desf.

C. incanus (también conocido como *C. creticus*)

C. inflatus Pourr. Ex Demoly (también conocido como *C. hirsutus* Lam. o *C. psilosepalus* Sweet)

C. ladanifer L.

C. laurifolius L.

C. libanotis L.

C. monspeliensis L.

C. munbyi Pomel

C. ochreatus Chr. Sm. ex Buch

C. osbeckiifolius Webb ex Christ.

C. parviflorus Lam.

C. populifolius L.

C. pouzolzii Delile

C. salviifolius L.

C. sintenisii Litard. (también conocido como *C. albanicus* E. F. Warburg ex Heywood)

C. symphytifolius Lam.

C. incanus incluye dos subespecies, *C. incanus ssp. tauricus* así como *C. incanus ssp. undulatus*. De ellas, la subespecie *C. incanus ssp. tauricus* se usa especialmente de manera preferible para la extracción.

El extracto se aísla de las partes aéreas de la plantas. Preferiblemente, se usan los brotes aéreos de las plantas que se han regenerado en el mismo año. Las partes de la planta se someten a una extracción directamente tras la cosecha, es decir, en estado crudo. Alternativamente, las partes de la planta se secan antes de la extracción. Posteriormente, las hojas de la planta se pican de una manera adecuada, por ejemplo frotándolas o cortándolas.

La extracción se lleva a cabo con un disolvente adecuado. Disolventes adecuados son agua, alcoholes tales como metanol, etanol o isopropanol, o disolventes clorados tales como diclorometano, así como acetona, acetilacetona, amoniaco o ácido acético glacial. También pueden usarse mezclas de los disolventes citados. Preferiblemente, se usa una mezcla de agua con metanol o etanol.

La extracción se realiza normalmente a temperatura ambiente. Sin embargo, también es posible realizar la extracción a temperaturas elevadas de 25°C hasta, si es necesario, el punto de ebullición del disolvente usado. Se prefiere una extracción a temperatura ambiente.

5 Además pueden usarse para la extracción grasas tales como manteca de cerdo, ceras tales como cera de abejas, o aceites tales como aceite de oliva y aceite de almendras. Preferiblemente se usa aceite de almendras.

Con el fin de lograr un rendimiento lo más alto posible, el material vegetal puede extraerse múltiples veces. En este caso, pueden usarse disolventes diferentes en las diferentes etapas de extracción, o una extracción con un disolvente puede ir seguida por una extracción con una grasa, cera o aceite, y viceversa.

10 Mediante la extracción se obtiene un producto bruto líquido o semisólido, que puede usarse en esta forma para la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de la gripe.

El producto bruto también puede concentrarse y/o secarse y/o prepararse adicionalmente antes de procesarse para dar lugar a un medicamento. Por ejemplo, la preparación puede incluir etapas de purificación conocidas por un experto habitual en la técnica, tales como centrifugación, filtración, y decantación con el fin de eliminar los materiales suspendidos del extracto.

15 Por tanto la presente invención se refiere además a un extracto seco. Para la preparación del extracto seco, el disolvente puede eliminarse del extracto bruto líquido, el extracto concentrado o el extracto purificado, por ejemplo mediante secado por pulverización, liofilización o secado al vacío.

El extracto descrito se usa para la profilaxis y/o el tratamiento de la gripe.

20 Los agentes infecciosos de la gripe son virus del tipo A, B y C. La gripe que se produce de manera estacional en seres humanos está provocada por el virus de la gripe de tipo A con los subtipos H1, H2 y H3, así como por el virus de la gripe de tipo B. La gripe aviar está provocada principalmente por los subtipos H5, H7 y H9.

El extracto descrito es particularmente adecuado para la profilaxis y/o el tratamiento de la gripe aviar. En particular, el extracto puede usarse para la profilaxis y/o el tratamiento de la gripe aviar provocada por el subtipo H7.

25 El extracto puede usarse en cualquier forma de aplicación galénica conocida por un experto habitual en la técnica, por ejemplo como comprimidos, comprimidos recubiertos con película, cápsulas, polvos, granulados, grageas, pomadas, cremas, disoluciones o pulverizadores. El extracto también puede usarse en forma de un polvo para su adición a alimentos, en particular en comida para animales.

30 En este caso, el extracto puede procesarse con los adyuvantes galénicos comunes, tales como aglutinantes de comprimidos, cargas, conservantes, agentes de degradación de comprimidos, reguladores del flujo, agentes de reblandecimiento, agentes humectantes, agentes de dispersión, emulsionantes, disolventes, agentes retardantes, antioxidantes, agentes que confieren consistencia, agentes para mejorar la penetración y/o propelentes.

El extracto también puede mezclarse con otros extractos vegetales, en particular con extractos vegetales con efecto similar o sinérgico.

35 Dependiendo del tipo de aplicación, la concentración del extracto variará en la forma de uso. Normalmente, la cantidad del extracto es de entre 1 y 1.000 mg por unidad de dosificación en formas de aplicación sólidas. Preferiblemente, la cantidad de extracto es de entre 5 y 500 mg por unidad. En formas de aplicación fluidas, el extracto puede estar presente en una concentración de 1 µg/ml a 100 mg/ml, preferiblemente de 25 µg/ml a 50 mg/ml. En formas de aplicación semisólidas, el contenido de extracto es del 1 al 90% en peso, preferiblemente del 5 al 75% en peso.

40 El extracto se administra preferiblemente en forma de un comprimido, en el que el extracto está presente como extracto seco.

45 Se prefiere adicionalmente administrar el extracto en forma pomadas o cremas para la aplicación tópica. En este caso, se usa un extracto en el que los principios activos se han extraído de la planta mediante extracción con una grasa, cera o aceite. Se prefiere adicionalmente que el extracto seco se mezcle con una grasa, cera o aceite, o se disuelva en estos.

50 Se prefiere adicionalmente que el extracto sea un aerosol. El aerosol puede usarse para la desinfección de objetos y locales con los que han entrado en contacto o podrían potencialmente entrar en contacto agentes que causan gripe, en particular de instalaciones de cría de animales así como medios de transporte de cualquier tipo en los que se transportan seres humanos, animales y/o alimentos. Por ejemplo, puede pulverizarse un avión con el aerosol según la invención antes del despegue para evitar una propagación de la gripe aviar y así minimizar el peligro de infección para los seres humanos. El aerosol según la invención también puede pulverizarse en presencia de seres humanos, por ejemplo, en salas de espera, ya que no provoca ningún efecto tóxico en seres humanos.

El siguiente ejemplo ilustra la presente invención.

Se sometió a prueba el extracto con respecto a su toxicidad celular y viabilidad celular así como su actividad antiviral frente a virus de la gripe. Para ello, se disolvió el extracto en PBS (estéril) mediante calentamiento (1 h/100°C) (disolución madre 1 mg/ml). Las dosificaciones para los estudios *in vitro* fueron de 2, 10, 25 y 50 µg/ml de sistema.

5 El virus de gripe A/Bratislava/79 (H7N7) (FPV) (aviar) así como el virus de gripe A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8) (humano) sirvieron como aislados de virus.

Células de riñón canino Madin-Darby (MDCK), células A549 de la línea de células epiteliales de riñón de perro y líneas de células epiteliales de pulmón humanas sirvieron como líneas de células huésped.

Se usaron los siguientes métodos de prueba para la determinación de las características del extracto.

10 Investigaciones microscópicas:

En las investigaciones microscópicas, se trataron células epiteliales de pulmón A549 y células epiteliales de riñón de perro MDCK durante diferentes puntos de tiempo (9 h, 24 h, 32 h, 48 h) con diferentes concentraciones del extracto (2, 10, 25, 50 µg/ml) y posteriormente se investigaron mediante microscopía óptica. Los experimentos se realizaron por duplicado con controles.

15 Pruebas de viabilidad:

En las pruebas de viabilidad, se trataron células epiteliales de pulmón A549 y células epiteliales de riñón de perro MDCK durante diferentes puntos de tiempo (24 h, 48 h, 56 h, 72 h) con diferentes concentraciones del extracto (2, 10, 25, 50 µg/ml) y posteriormente se tiñeron con yoduro de propidio para determinar la razón de células vivas con respecto a muertas mediante citometría de flujo. Los experimentos se realizaron un total de cuatro veces.

20 Investigación de la activación de caspasas apoptóticas:

Para la investigación de la activación de caspasas apoptóticas, se trataron células A549 durante 48 h con 25 y 50 µg/ml del extracto además de los experimentos acordados. Después de esto, se lisaron las células, se separaron las proteínas celulares mediante electroforesis en gel, y se investigaron mediante inmunotransferencia de tipo Western con un anticuerpo anti-PARP (poli(ADP-ribosa)polimerasa, sustrato de caspasa) para la escisión apoptótica de esta proteína mediante caspasas. El inductor de apoptosis estaurosporina sirvió como estímulo de control positivo. Los experimentos se realizaron en dos lotes paralelos.

25

Investigaciones de la actividad antiviral:

Para las investigaciones de la actividad antiviral, se trataron previamente células epiteliales de pulmón A549 y células epiteliales de riñón de perro MDCK durante 30 minutos con diferentes concentraciones del extracto (2, 10, 25, 50 µg/ml) durante diferentes puntos de tiempo y posteriormente se infectaron con las cepas de virus de gripe A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) y A/PR8/34 (H1N1) en presencia del extracto. Se aislaron los sobrenadantes del medio a diferentes puntos de tiempo tras la infección (8 h o 9 h, 24 h, 36 h o 48 h) y se investigaron en ensayos de placas para detectar virus de gripe recién formados.

30

Investigación de cinéticas del efecto:

Para la investigación de cinéticas del efecto, se trataron células MDCK con 50 µg/ml del extracto durante diferentes puntos de tiempo (30 min. de preincubación, directamente tras la infección, o 2 h, 4 h y 8 h tras la infección). Se investigaron los sobrenadantes del medio tras 24 h para detectar los virus de progenie.

35

Investigación de la actividad antiviral tras la preincubación de los virus con el extracto:

Para la investigación de la actividad antiviral tras la preincubación de los virus con el extracto, se preincubaron disoluciones de infección que contenían virus (FPV) con 50 µg/ml del extracto durante 2 h. Entonces se realizó un experimento de infección en células A549 con esta disolución de infección en comparación con los virus sin tratar, y tras 24 h se detectaron los virus recién formados en una titulación de virus. Durante este tiempo, ya no había nada de extracto en el sobrenadante. Los virus previamente tratados usados para la infección se investigaron además directamente en un ensayo de placas para determinar su capacidad de infección en células MDCK en comparación con virus sin tratar.

40

Investigaciones microscópicas inmunofluorescentes con virus previamente tratados:

Se preincubaron disoluciones de infección que contenían virus (FPV) con 50 µg/ml del extracto durante 30 min. o durante la noche. Virus sin tratar así como infección de células previamente tratadas con virus que no se habían tratado previamente sirvieron como comparación. Entonces, se realizó un experimento de infección comparativo con virus sin tratar con una dosis de infección alta (MOI=200) y tras 1 h, se detectaron los virus infecciosos o la proteína recién formada mediante inmunofluorescencia con la ayuda de un anticuerpo específico

50

frente a una proteína viral (nucleoproteína (NP)). El punto de tiempo de detección temprana y la alta dosis de infección también permiten la detección de virus infecciosos o de agregados de virus.

Los resultados de las investigaciones descritas anteriormente se muestran de manera gráfica en las figuras 1 a 9.

5 Ejemplo

Preparación de un extracto a partir de *Cistus incanus ssp. tauricus*

Se usaron los brotes aéreos (hojas, pétalos y tallos) que se regeneraron para la extracción. Se seca el material vegetal en el exterior a la sombra a temperatura ambiente hasta que tiene un contenido en agua residual de no más del 10%. Posteriormente, se cortan las partes de la planta hasta un tamaño de ≤ 8 mm.

10 Se someten las partes cortadas de la planta a una percolación a 95°C con una cantidad diez veces superior de agua purificada Ph. Eur. durante de 4 a 5 horas. Se concentra la disolución obtenida a temperatura de vapor de agua de 75 a 80°C hasta del 18 al 19% del volumen original mediante un evaporador de placas. El contenido en sustancia seca es de aproximadamente el 45%.

15 Se aumenta el contenido en sustancia seca hasta del 50 al 51% mediante un evaporador con agitación calentando el extracto durante 4 horas a de 110 a 114°C a presión reducida (0,6 bares). Posteriormente, se somete el extracto a ebullición durante 1 h a 100,3°C para obtener un contenido en sustancia seca de aproximadamente el 53%.

20 Finalmente, se realiza un secado en transportador a vacío a 16 mbar con gradientes de temperatura decreciente (140°C, 120°C, 90°C, 20°C). El contenido en sustancia seca es del 92 al 93%. Posteriormente se tritura el extracto. Entonces se prepara la disolución madre descrita anteriormente a partir de este extracto.

Investigaciones microscópicas

25 En las imágenes microscópicas no pudieron determinarse cambios significativos con respecto al número de células y la morfología celular en comparación con las muestras control sin tratar para la serie de investigación con células MDCK y células A549 para ninguna de las concentraciones de extracto usadas o los valores de tiempo investigados.

Prueba de viabilidad

30 Los resultados de la prueba de viabilidad se muestran en las figuras 1 y 2, en las que el número de células vivas de cada una de las muestras respectivas se resume de manera comparativa como el promedio de las cuatro determinaciones realizadas. El resultado fue que no pudo determinarse ninguna influencia negativa del extracto sobre la supervivencia de células MDCK o A549 en todo el periodo de observación de 72 h.

Investigación de la activación de caspasas apoptóticas

35 Los resultados de la investigación de la activación de caspasas apoptóticas se muestran en la figura 3, que ilustra resultados del análisis de inmunotransferencia de tipo Western para la determinación de la actividad caspasa. Mientras que el estímulo control estaurosporina (estauro) conduce a una escisión eficaz del sustrato de caspasa (poli(ADP-ribosa)polimerasa, banda de PARP escindida), no puede detectarse tal actividad ni en las células sin tratar (simulado) ni las tratadas con extracto (25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$). Una inmunotransferencia de control frente a la proteína ERK2 sirvió como control para la carga de proteína uniforme. Como resultado puede concluirse que el tratamiento con extracto vegetal no conduce a la activación de caspasas y la inducción de la apoptosis en las concentraciones usadas y en el periodo observado.

40 Investigaciones de actividad antiviral

45 En las investigaciones de la actividad antiviral del extracto, las figuras 4-7 muestran resultados a modo de ejemplo de cada uno de dos experimentos independientes con determinaciones de títulos múltiples. Los títulos de virus se muestran en comparación con los títulos de muestras de infección sin tratar. En células A549 infectadas con FPV, incluso concentraciones inferiores condujeron a una reducción significativa de los títulos de virus tras 9 h y 24 h, títulos de virus que se reducen en más de dos órdenes de magnitud a la concentración superior de principio activo. Debido a la alta dosis de infección, las muestras sin tratar ya están en una fase estacionaria de crecimiento del virus tras 48 h, de modo que los efectos inhibitorios ya no pueden mostrarse claramente. Todavía, incluso en este caso, se observa una reducción de los títulos de virus para la concentración superior de principio activo. La mayor reducción de títulos de virus también pudo encontrarse con el mismo aislado de virus en células MDCK al tratar las muestras con 25-50 $\mu\text{g/ml}$ del extracto, en las que también se logra una inhibición en múltiples órdenes de magnitud. Sorprendentemente, se observa un ligero aumento de títulos de virus en algunos lotes a concentraciones inferiores de principio activo. Sin embargo, ya que esto no se produjo de manera sistemática en todas las muestras y

especialmente no pudo observarse dentro del periodo de observación más largo de 36 h, puede suponerse que es un artefacto experimental.

También se observa una inhibición dependiente de la concentración de la propagación del virus en células MDCK para el aislado de virus humano PR8 usado alternativamente en todos los valores de tiempo investigados. De acuerdo con experimentos anteriores, también hubo en este caso una reducción en los títulos de virus a la concentración superior de principio activo de 50 µg/ml.

En resumen, puede mencionarse que, especialmente a concentraciones de extracto de 25 µg/ml y 50 µg/ml, se observa un fuerte efecto inhibitorio sobre la propagación del virus de diferentes virus de la gripe en las dos líneas de células huésped.

10 Investigación de las cinéticas del efecto

En la figura 8 se muestran gráficamente resultados de las investigaciones de la actividad antiviral tras la preincubación de los virus con extracto. Esta investigación de las cinéticas del efecto de títulos de virus comparativos muestra que sólo podía reconocerse un fuerte efecto inhibitorio sobre la propagación del virus con la preincubación de las células con el extracto. El extracto no mostró ningún efecto adicional cuando se añadió > 2 h tras la infección.

Investigación de la actividad antiviral tras la preincubación de los virus con extracto

Se realizó un experimento de infección comparativo con virus sin tratar con una disolución de infección que se preincubó con extracto durante 2 h, y se determinaron los virus recién formados tras 24 h en una titulación de virus (figura 9B). Además, se investigaron directamente los virus previamente tratados en un ensayo de placas para determinar su capacidad de infección en comparación con virus sin tratar (figura 9A). Resultó que la preincubación ya tenía un efecto en la determinación directa de la capacidad de infección en el ensayo de placas. Esto se hizo más evidente cuando se permitió a los virus tratados con extracto frente a los virus sin tratar un ciclo de infección durante 24 h. En este caso, pudieron reconocerse reducciones de título de aproximadamente un orden de magnitud.

En resumen, puede decirse que la preincubación de los virus con extracto ya era suficiente para contribuir a una reducción significativa de la capacidad de infección de los virus.

Investigaciones microscópicas inmunofluorescentes con virus previamente tratados:

En las investigaciones microscópicas inmunofluorescentes con virus previamente tratados, podía reconocerse ya una elevada concentración de nucleoproteína (NP) en el núcleo celular tras 1 h, lo que muestra que una parte principal de los complejos de ribonucleoproteína viral que contienen NP ha migrado al interior del núcleo celular o que ya ha comenzado la producción de nuevas proteínas virales. Aunque esta distribución sólo difería marginalmente en células infectadas que se trataron previamente con extracto, podía reconocerse un cambio significativo especialmente tras la preincubación de los virus infecciosos durante la noche. En este caso, se tiñeron agregados o partículas de virus sólo en determinados puntos y es difícil encontrar una concentración de la tinción en el núcleo celular. A partir de esto, puede concluirse que los virus previamente tratados sólo pueden infectar las células de manera insuficiente o captarse al interior de las células.

Las investigaciones de morfología, viabilidad y activación de caspasas de las células tratadas con extracto muestran que las concentraciones de extracto de hasta 50 µg/ml no representan ningún efecto tóxico significativo sobre las células huésped A549 y MDCK usadas en este caso, y no inducen muerte celular ni apoptótica ni necrótica aumentada. Además, no pudo reconocerse ninguna reducción significativa en el número de células, de modo que el crecimiento celular tampoco se reduce por el efecto del extracto. En resumen, una evaluación de los resultados de la actividad antiviral del extracto teniendo en cuenta varianzas experimentales permite mencionar que el extracto demuestra un efecto antiviral fuerte y significativo sobre la propagación de los virus de la gripe en cultivo celular en concentraciones de 25-50 µg/ml.

El extracto vegetal sometido a prueba demostró una actividad antiviral frente a virus de la gripe en cultivo celular sin ser significativamente tóxico para las células huésped. A nivel molecular, se supone que la actividad antiviral está mediada en gran parte mediante una interacción física directa de los componentes del extracto con la partícula de virus, aunque no pueden descartarse otros efectos adicionales del extracto sobre las células.

En un estudio adicional, se ha investigado la propiedad inhibidora de virus de *Cistus* sobre virus de la gripe altamente patógenos de los subtipos H5N1 (gripe asiática) y H7N7. El aislado de virus A/Tailandia/1(KAN-1)/2005 (H5N1) (humano) así como el virus de la gripe A A/Bratislava/79 (H7N7) (FPV) (aviar) sirvieron como aislados de virus en el siguiente estudio.

Inhibición de la capacidad de aglutinación de virus H5N1 y H7N7 altamente patógenos:

Se diluyó el extracto de *Cistus* hasta concentraciones de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32 de la concentración de disolución madre. Se diluyeron aislados de virus H5N1 y H7N7 hasta una concentración final de 1/64 de la

- 5 concentración original. Se mezcló cada disolución de *Cistus* en una placa de 96 pocillos con 50 µl de la disolución de H5N1 (UFP: $4,5 \times 10^8$) y la disolución de H7N7 (UFP: $5,7 \times 10^8$), respectivamente, por pocillo. Se incubó la placa a 37°C en un incubador de CO₂ durante una hora, después se añadieron 50 µl de sangre de pollo diluida hasta 1/20 por pocillo y volvió a incubarse la placa durante 30 - 45 minutos en un refrigerador. Como control, o bien se dejaron sin tratar o bien se trataron eritrocitos con H5N1 y H7N7, respectivamente, omitiendo de ese modo el extracto de *Cistus*.
- Como resultado, se encontró que el extracto tenía la capacidad de inhibir eficazmente la reticulación de eritrocitos en aislados de virus H5N1 y H7N7. Por tanto, los extractos de *Cistus* pueden reducir significativamente la capacidad de unión de hemaglutinina sobre receptores celulares en H5N1 y H7N7.
- 10 Inhibición de la capacidad de propagación de virus H5N1 altamente patógenos:
- Se diseminaron células A549 y se dejó que crecieran durante 24 horas. Después, se preincubaron las células con extracto de *Cistus* durante 30 minutos. Se usaron concentraciones de extracto de 50 µg/ml, 75 µg/ml y 100 µg/ml. Asimismo, se preincubó el virus H5N1 con el extracto (50 µg/ml, 75 µg/ml y 100 µg/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la preincubación se infectaron las células con el subtipo H5N1 del virus de la gripe A (MOI: 0,001) durante 30 minutos con giro ocasional a 37°C en un incubador de CO₂. Posteriormente, se lavaron las células con PBS para eliminar virus no unidos y se incubaron con extracto de *Cistus* (50 µg/ml, 75 µg/ml y 100 µg/ml) durante 20 horas en el incubador de CO₂ a 37°C. Tras 20 horas de incubación se eliminaron los sobrenadantes y se midió el título de virus mediante el ensayo de placas. Se usaron como controles muestras infectadas sin tratar.
- 15 Los resultados se muestran en la figura 10 en la que se ha fijado que la muestra control sin tratar representa el 100%. Se han investigado dos cargas diferentes (A y B) de extracto.
- 20 Tal como puede deducirse de la figura 10, el extracto reduce significativamente el número de virus de progenie.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un extracto procedente de plantas del género *Cistus* para la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de la gripe, en el que el extracto se obtiene de *Cistus incanus*.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que el extracto se aísla de las partes aéreas de la planta.
- 5 3. Uso según al menos una de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el extracto está en forma líquida, seca o semisólida.
4. Uso según al menos una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el extracto es un extracto acuoso o un extracto alcohólico.
5. Uso según al menos una de las reivindicaciones 1 a 4, para la profilaxis y/o el tratamiento de la gripe aviar.
- 10 6. Uso según al menos una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el extracto se administra por vía oral o tópica.
7. Uso según al menos una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el extracto se pulveriza.

Figura 1. Prueba de viabilidad (tinción con PI)

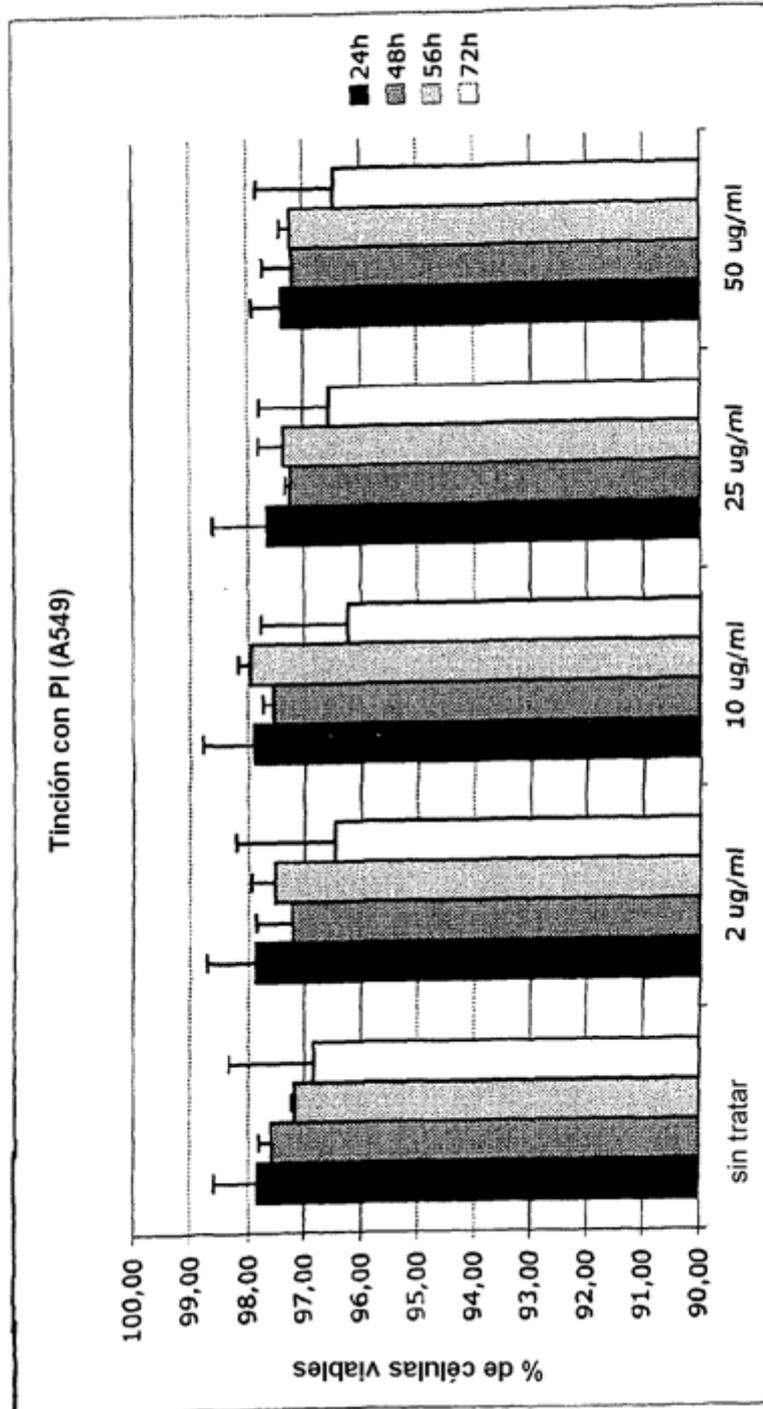


Figura 2. Prueba de viabilidad (tinción con PI)

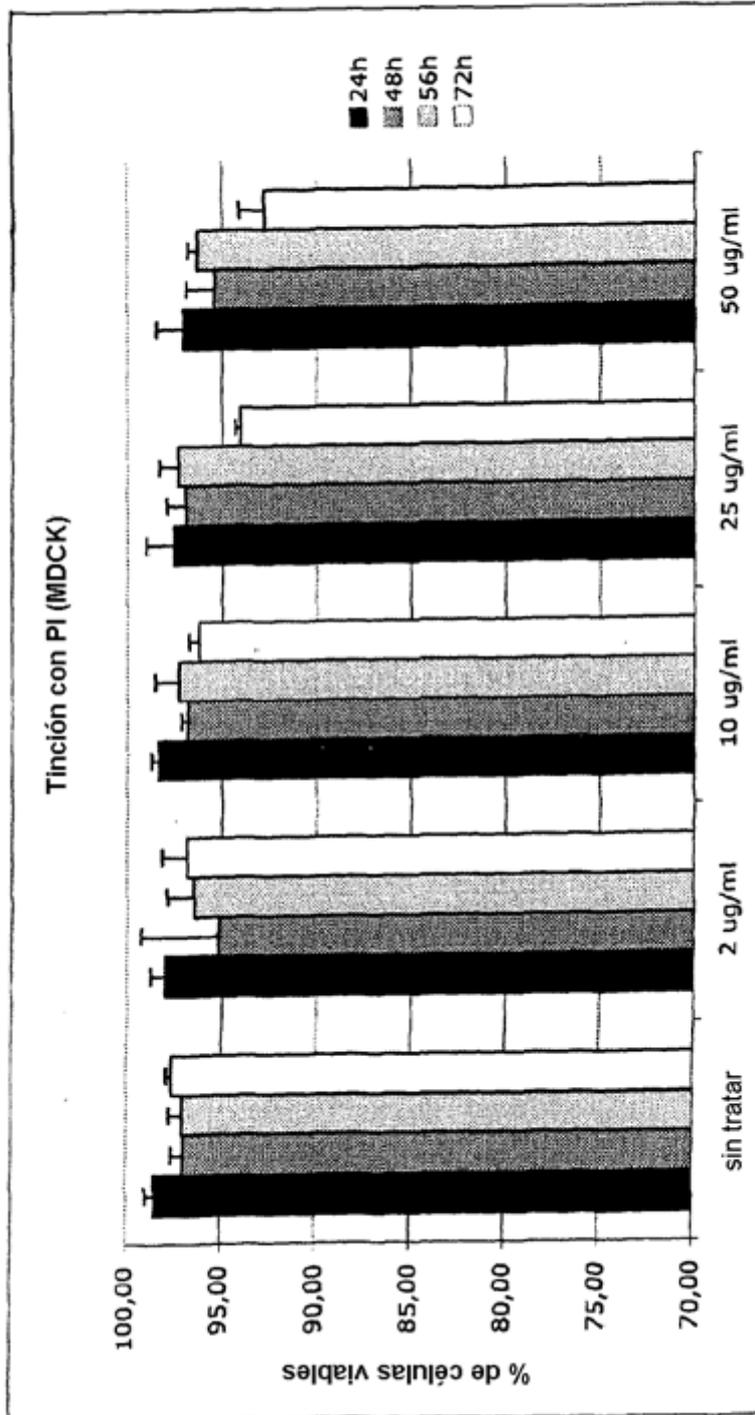


Figura 3. Prueba de apoptosis (inmunotransferencia de PARP)

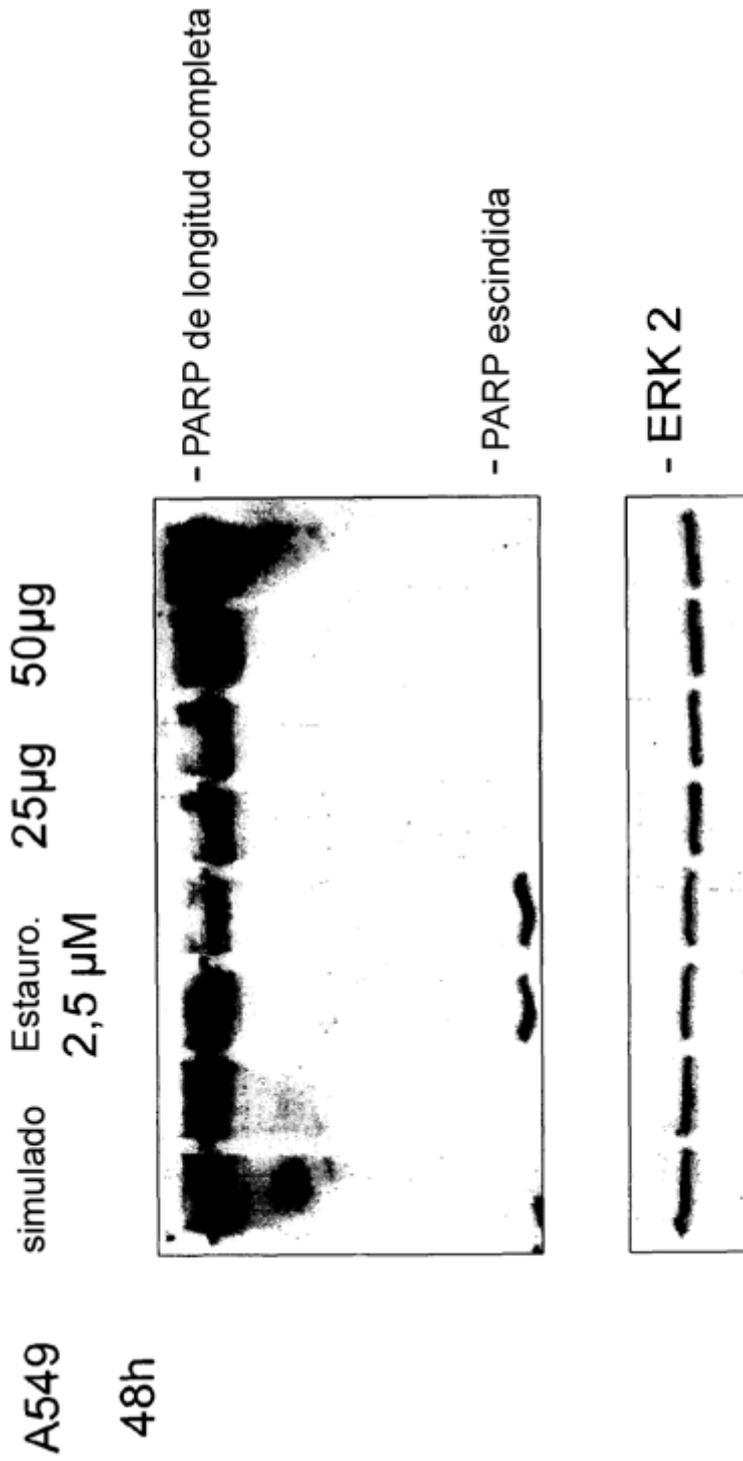
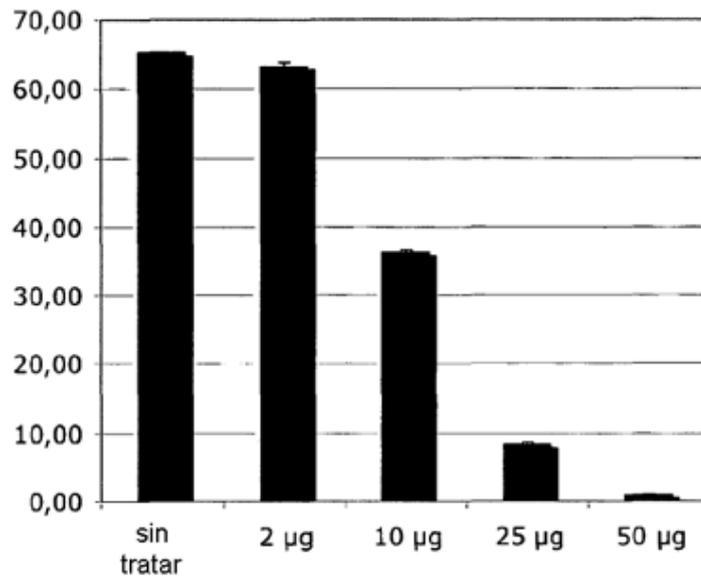


Figura 4. Aislado de virus FPV, línea celular A549



h

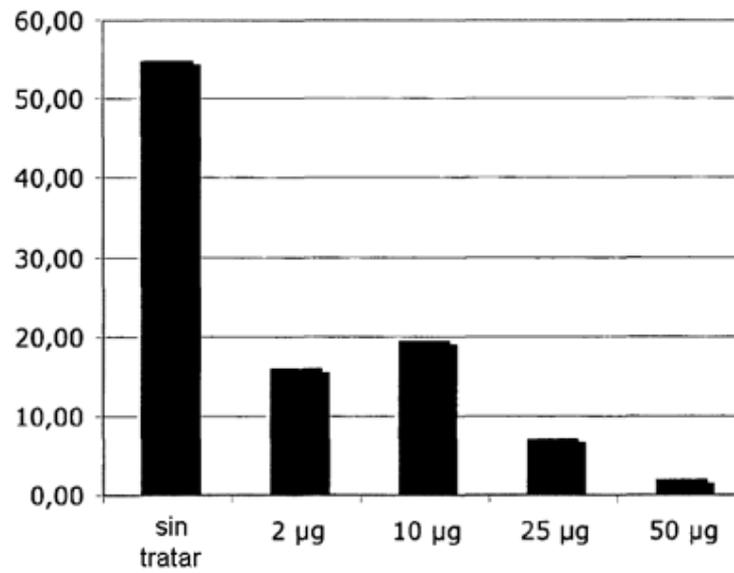
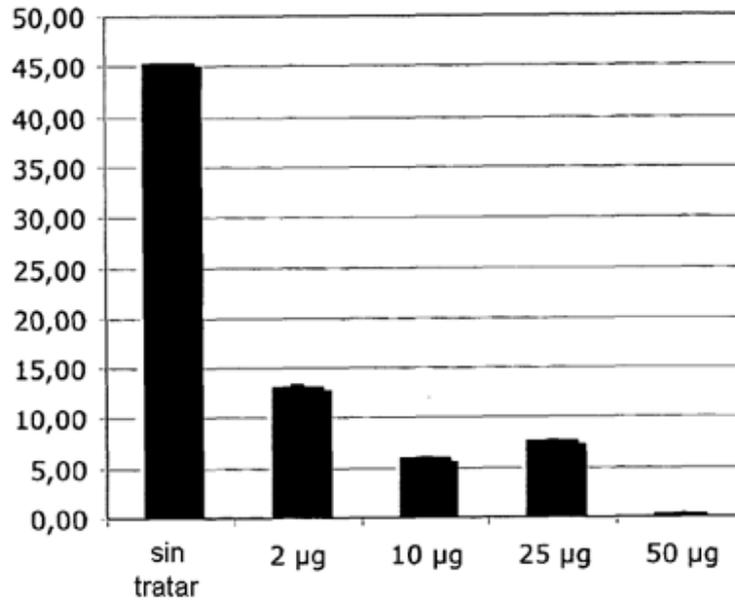


Figura 4. Aislado de virus FPV, línea celular A549



4h

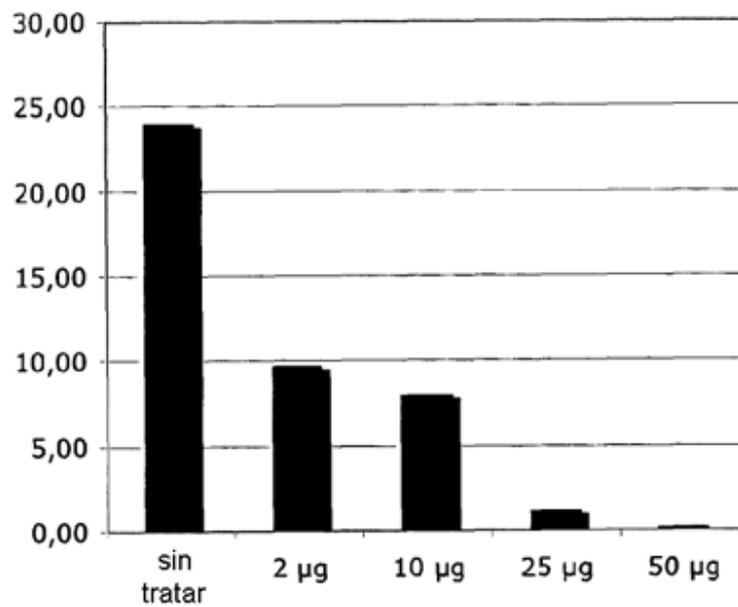
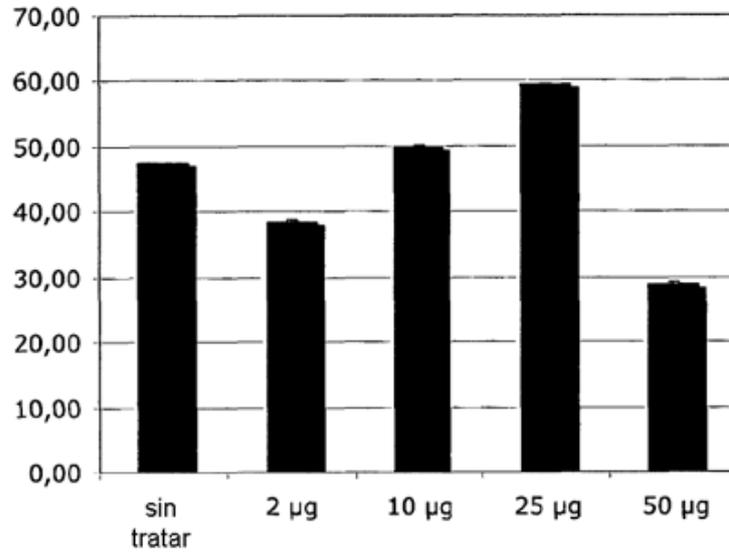


Figura 4. Aislado de virus FPV, línea celular A549



8h

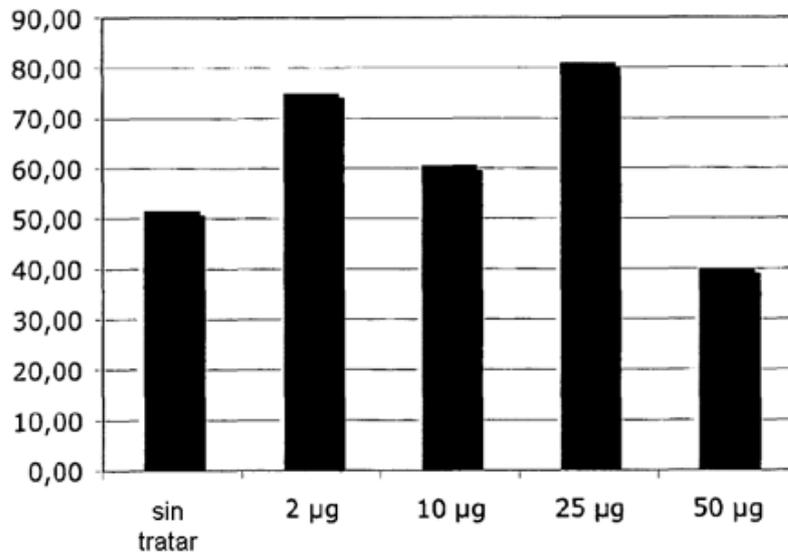
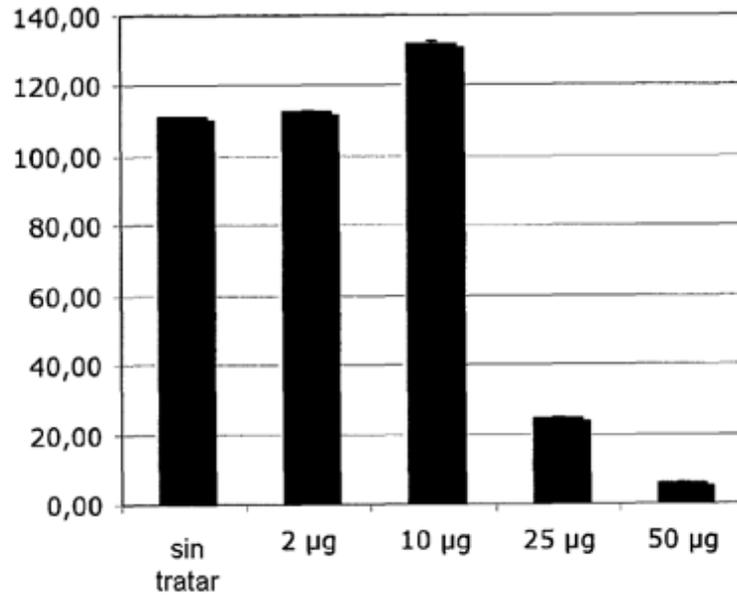


Figura 5. Aislado de virus FPV, línea celular MDCK



h

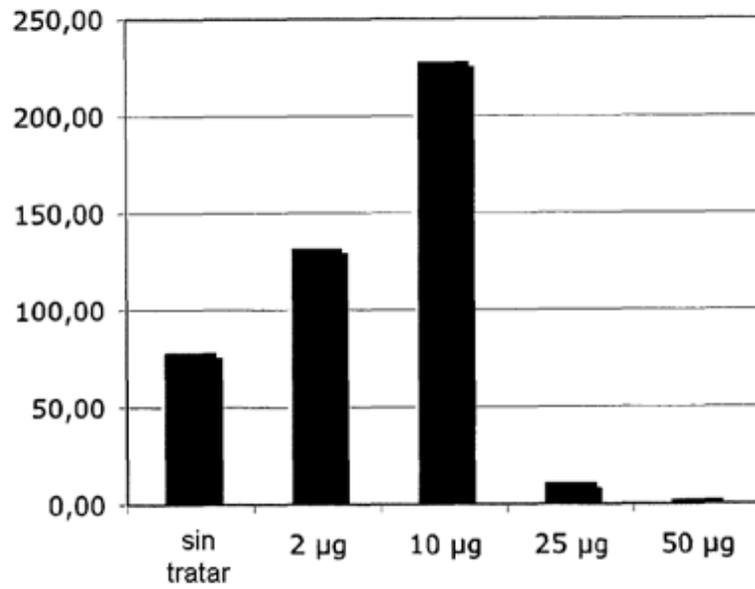
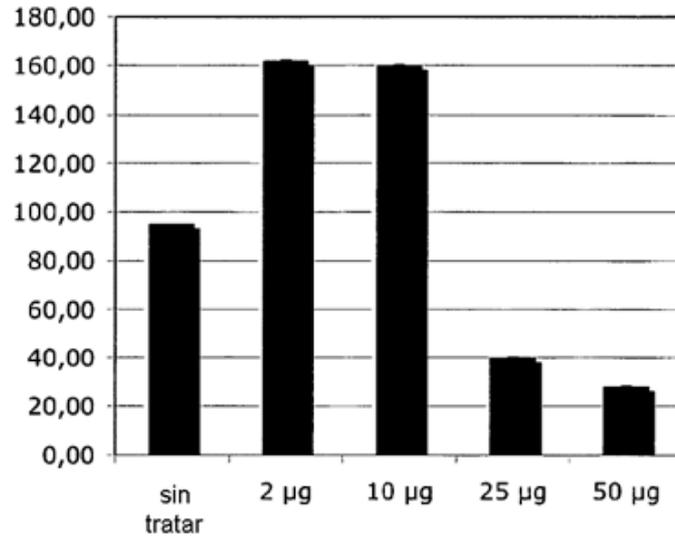


Figura 5. Aislado de virus FPV, línea celular MDCK



4h

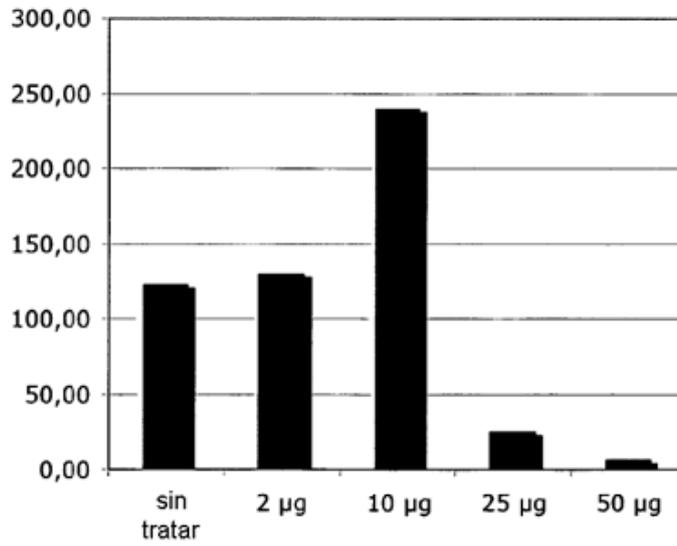
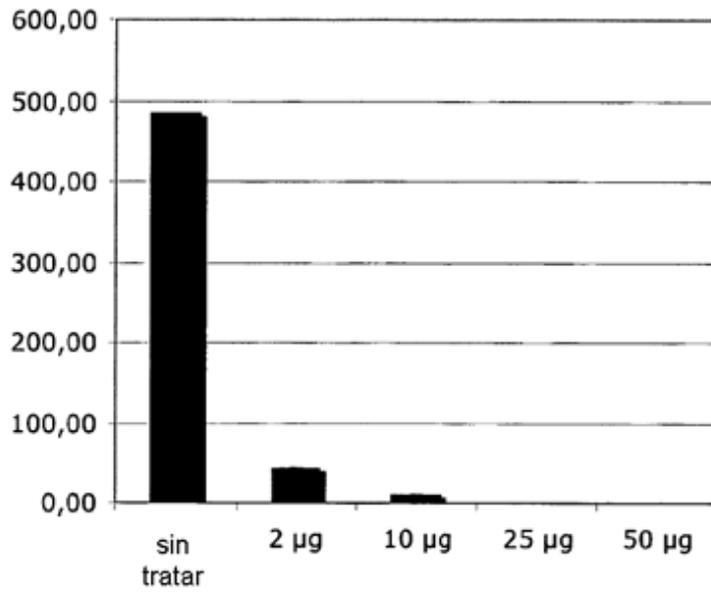


Figura 5. Aislado de virus FPV, línea celular MDCK



6h

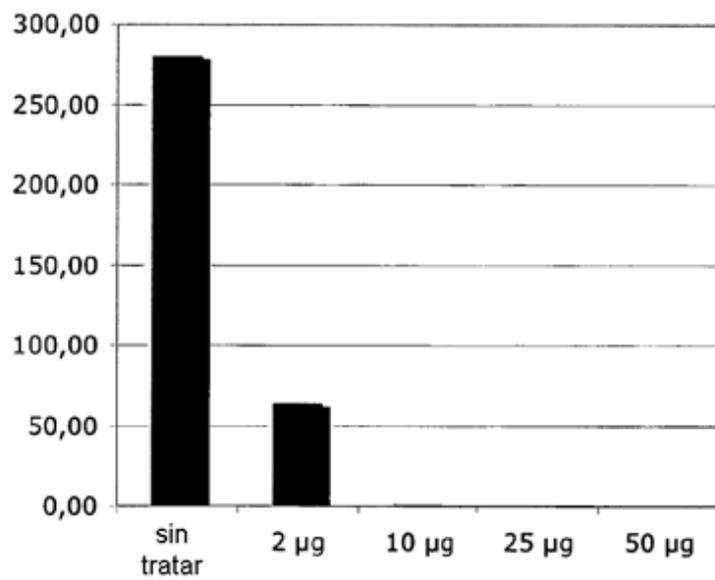
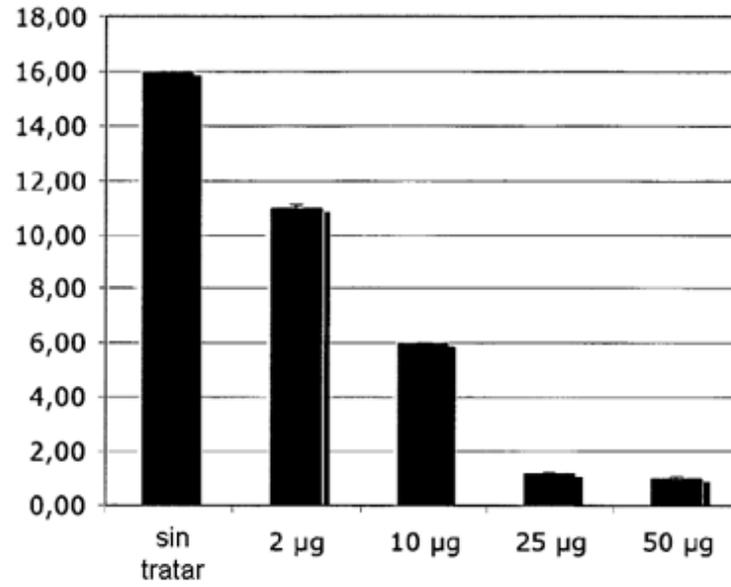


Figura 6. Aislado de virus PR8, línea celular MDCK



h

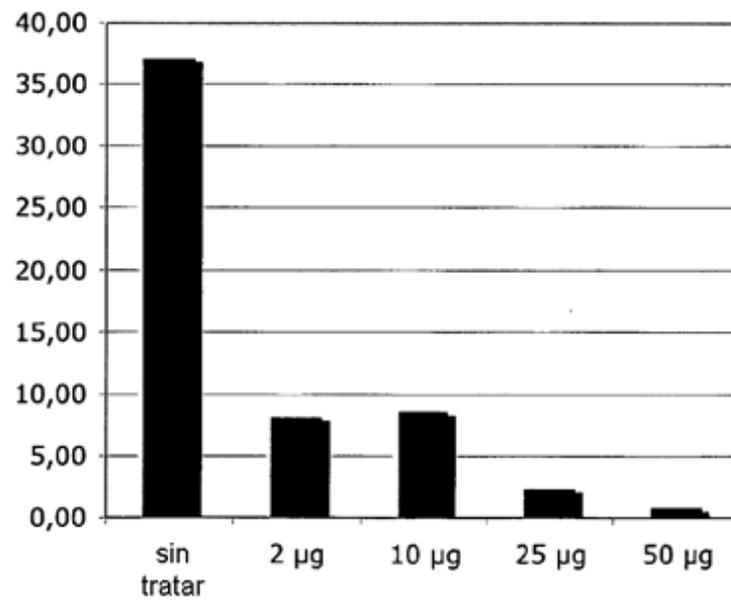
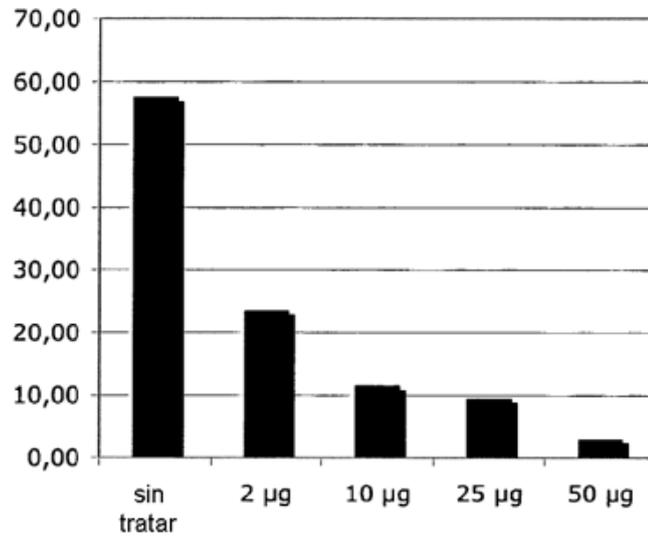


Figura 6. Aislado de virus PR8, línea celular MDCK



4h

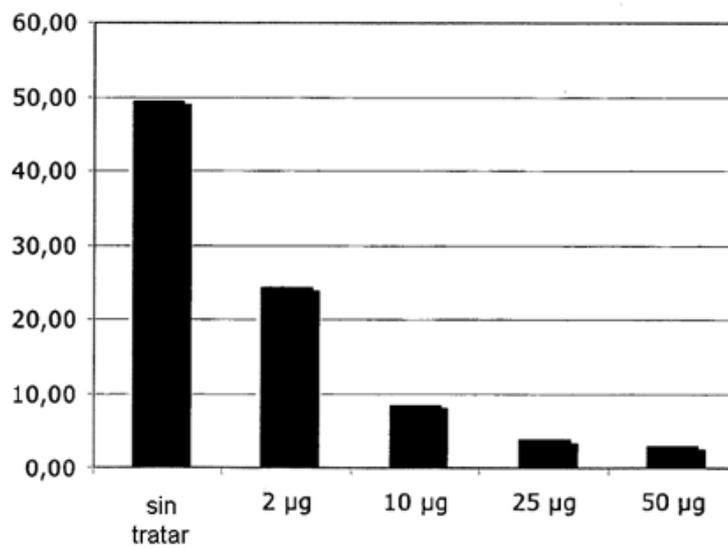
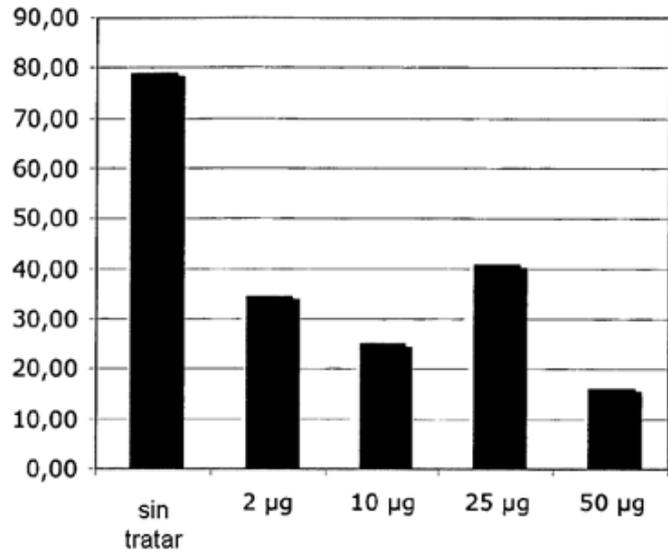


Figura 6. Aislado de virus PR8, línea celular MDCK



6h

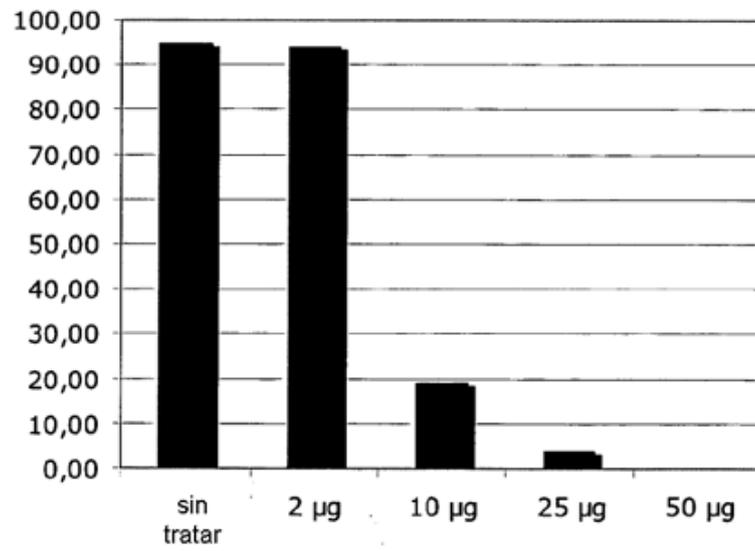


Figura 7. Aislado de virus PR8, línea celular A549

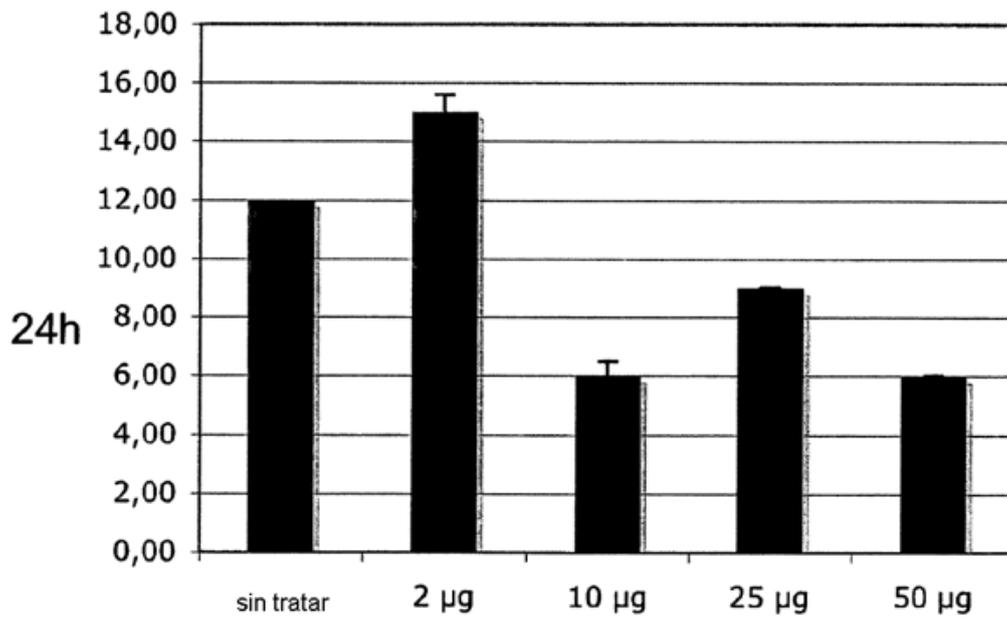
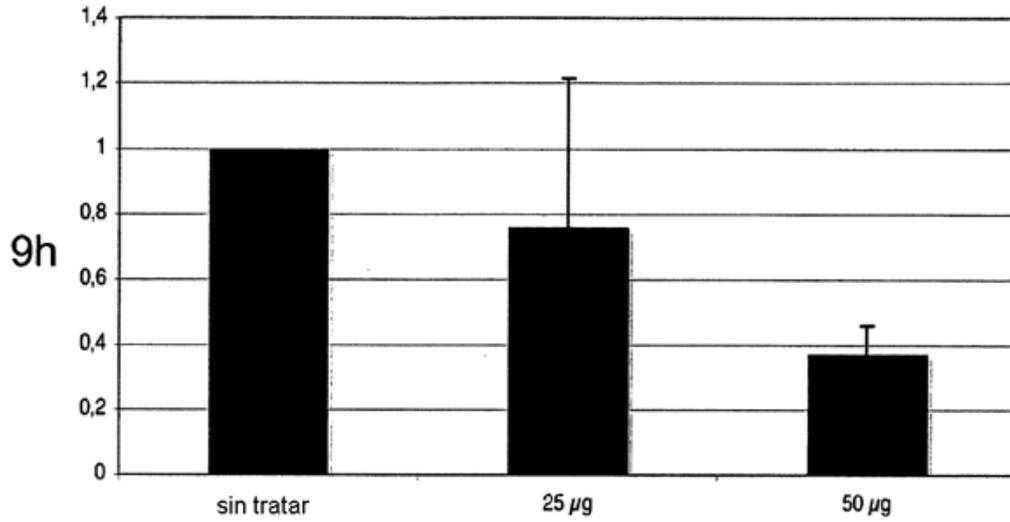


Figura 8. Aislado de virus FPV, línea celular MDCK

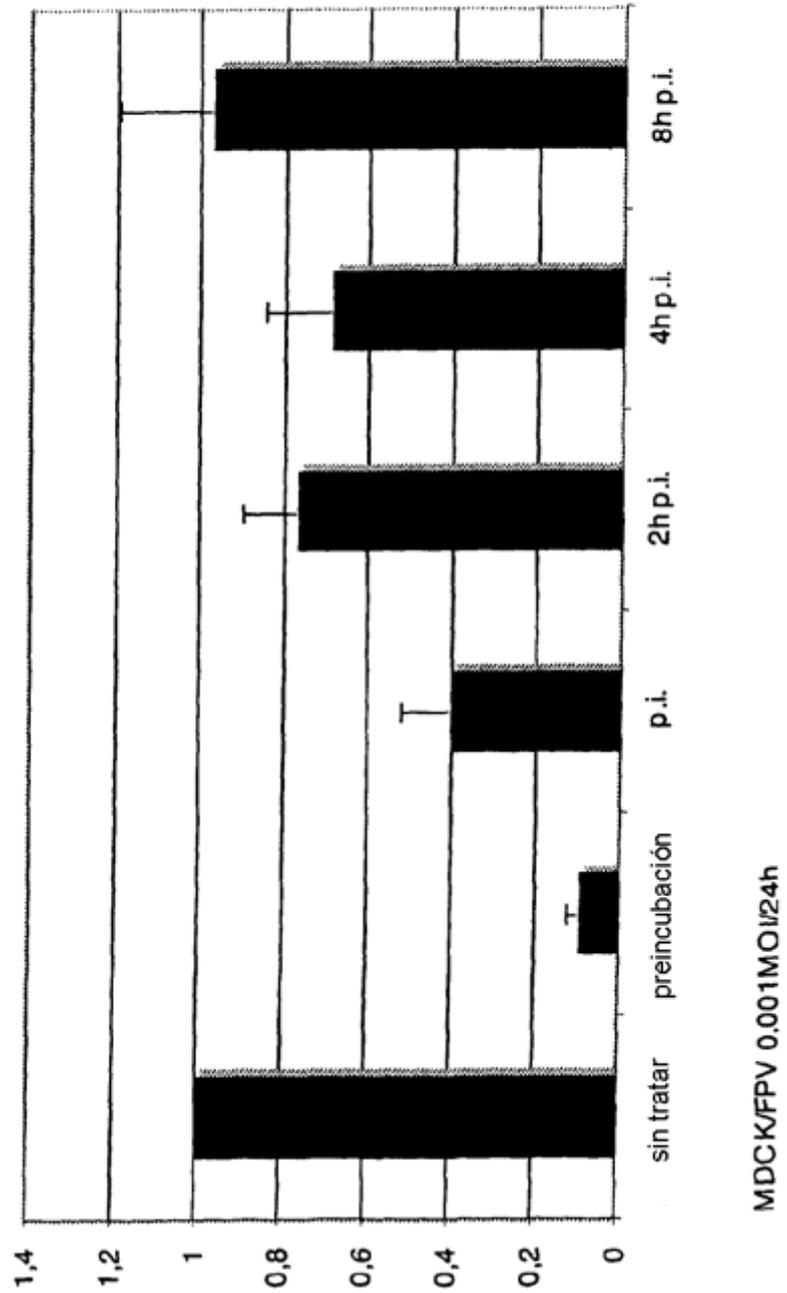


Figura 9. Aislado de virus FPV, línea celular MDCK

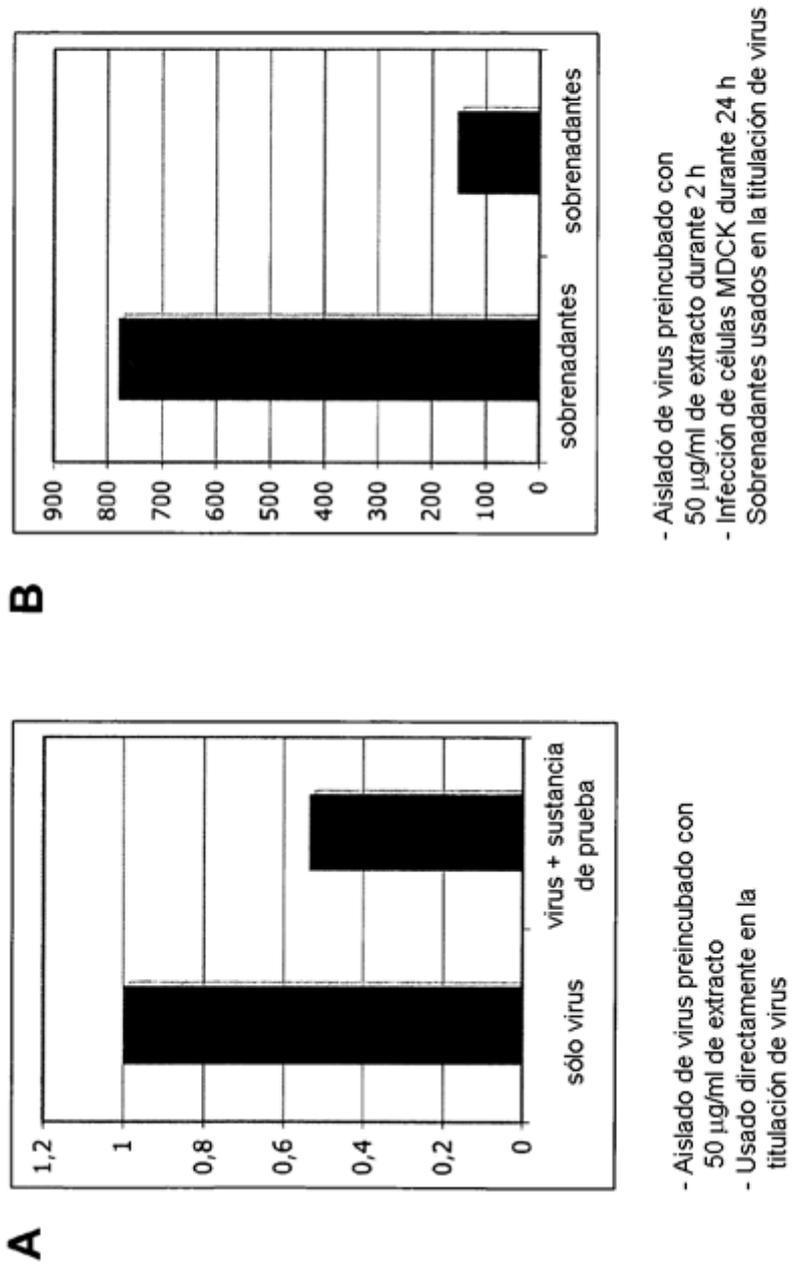


Figura 10.
Capacidad de propagación de virus H5N1 altamente patógenos

