

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 495**

51 Int. Cl.:

A61K 36/18 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2010 E 10702766 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 2389184**

54 Título: **Actividad contra el dengue de extractos de Cissampelos pareira**

30 Prioridad:

23.01.2009 IN DE01412009

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

10.04.2013

73 Titular/es:

**RANBAXY LABORATORIES LIMITED (33.3%)
12th Floor, Devika Tower 06, Nehru Place
New Delhi 110019, IN;
INTERNATIONAL CENTRE FOR GENETIC
ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY (33.3%) y
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY MINISTRY
OF SCIENCE & TECHNOLOGY, GOVT. OF INDIA
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**BHATNAGAR, PRADIP KUMAR;
KATIYAR, CHANDRA KANT;
KHANNA, NAVIN;
UPADHYAY, DILIP JATASHANKAR;
SWAMINATHAN, SATHYAMANGALAM;
SRINIVAS, KONA;
SHARMA, NAVIN;
KANAUJIA, ANIL;
SOOD, RUCHI;
SINGHAL, SMITA;
SHUKLA, GYANESH;
DUGGAR, RAJEEV;
PAREEK, PAWAN KUMAR;
SINGH, YOGENDRA;
KHAN, SEEMA y
RAUT, RAJENDRA**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 400 495 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

Actividad contra el dengue de extractos de *Cissampelos pareira*

5 Sector de la invención

La presente invención se refiere a la actividad contra el dengue de extractos de *Cissampelos pareira*. También se dan a conocer composiciones farmacéuticas que comprenden extractos de *Cissampelos pareira* y procedimientos para la preparación de extractos de *Cissampelos pareira*.

10

Antecedentes de la invención

Los virus del dengue (DEN1-4), que son miembros de la familia *Flaviviridae* transmitidos por mosquitos, son patógenos humanos de importancia mundial. Del millón de casos anuales de fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque por dengue, aproximadamente entre el 2 y el 5% son mortales. Actualmente, no existe ninguna vacuna ni fármaco antiviral para tratar las infecciones por DEN (Ann, N.Y. Acad. Sci., 951, pág. 262-271 (2001), y *Clinical Microbiology Reviews*, julio, pág. 480-496 (1998)).

15

Las hierbas medicinales se han erigido en la única vía para satisfacer la necesidad de nuevos remedios seguros, eficaces y relativamente baratos para diversos trastornos. Representan el sector con mayor crecimiento dentro de la medicina alternativa. Las hierbas medicinales se producen en diferentes formas, desde hierbas en bruto sometidas a decocción hasta extractos refinados, concentrados y estandarizados. Los beneficios para la salud obtenidos de la toma de dichas hierbas también varían según la calidad de los productos y el conocimiento de los consumidores sobre los mismos. Algunos de estos productos tienen que consumirse bajo la supervisión de un médico, particularmente los indicados para enfermedades graves, aunque, en general, la mayoría de las hierbas medicinales son inocuas.

20

25

Se han evaluado científicamente muchas plantas como agentes antivirales en modelos experimentales, por ejemplo, *Acacia nilotica* para determinar sus efectos inhibidores sobre la proteasa del virus de la hepatitis C (Hussein y otros, *Phytotherapy Res.*, 14(7) pág. 510-16 (2000)), *Andrographis paniculata* para determinar su actividad inhibidora del VIH-1 (Reddy y otros, *Nat. Prod. Res.*, 19(3): pág. 223-30, (2005)), *Areca catechu* para determinar su actividad inhibidora sobre la formación de placas del virus del herpes simple de tipo 1 (Hattori y otros, *Phytotherapy Res.*, 9, pág. 270-276 (1995)), y también su inhibición de la ADN-polimerasa del virus de la hepatitis B (Chung y otros, *Phytotherapy Res.*, 9, pág. 429-434 (1995)), *Azadirachta indica* para determinar su inhibición de la replicación del virus del dengue de tipo 2 (Parida y otros, *J. Ethnopharmacol.*, 79, pág. 273-78 (2002)), *Glycyrrhiza glabra* para determinar su inhibición del crecimiento y la citopatología de diversos virus ADN y ARN no relacionados y para determinar su inactivación irreversible del virus del herpes simple (Pompei y otros, *Nature*, 281(5733): pág. 689-90 (1979)), *Ocimum basilicum* para determinar su inhibición de virus ADN, por ejemplo, el virus del herpes (HSV); adenovirus (ADV); hepatitis B, y también para determinar su inhibición de virus ARN, por ejemplo, virus de Coxsackie de tipo B1 (CVB1), enterovirus 71 (EV 71) (Chiang y otros, *Clin. Exp. Pharm. Physiol.*, 32, pág. 811-16 (2005)), *Phyllanthus amarus* para la determinación de su inhibición de la expresión del gen del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) en células de hepatoma humano (Yeh y otros, *Antiviral Res.*, 20, pág. 185-92 (1993)), y para determinar su eliminación del HBsAg (Thyagarajan y otros, *Lancet*, pág. 764-66 (1988)), y *Terminalia chebula* para determinar su actividad contra la infección por virus del herpes simple de tipo 1 (Kurokawa y otros, *Antiviral Res.*, 27, pág. 19-37 (1995)). Además, los agentes antivirales de origen vegetal pueden tener una buena aceptabilidad por el hecho de ser inocuos y económicos (Parida y otros, *J. Ethnopharmacol.*, 79, pág. 273-278 (2002)).

30

35

40

45

Aunque la asociación de diversos extractos de hierbas con una actividad antiviral está bien documentada, hasta el momento no se ha llevado a cabo ninguna investigación sistemática de la actividad contra los virus DEN en extractos vegetales. Se descubrió que existen extractos de diferentes partes de plantas que pueden proporcionar una fuente de compuestos antivirales (Herrmann y otros, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 124, pág. 865-74 (1967)). Esto motivó a diversos investigadores para llevar a cabo una búsqueda coordinada de compuestos antivirales de origen vegetal que, a su vez, culminó en un informe que ponía de manifiesto que diversas plantas son eficaces en la inhibición del crecimiento de varios virus (Aswal y otros, *Ind. J. Exp. Biol.*, 34, pág. 444-67 (1996)).

50

55

La *Cissampelos pareira* Linn (familia: *Menispermaceae*, nombre en inglés: *velvet leaf*, nombre en hindi: *patha*, nombre en sánscrito: *ambasthaki*) es un arbusto trepador presente en las regiones cálidas de Asia, África Oriental y América, y común en la India y Sri Lanka. Es común en las zonas cálidas y secas de las regiones tropicales y subtropicales de la India hasta una altitud de unos 1.500 m. Se encuentra en Himachal Pradesh, Chota Nagpur, Bihar, Bengala Occidental, el Punjab, Rajastán, particularmente en la parte oriental de Aravalli, los bosques montañosos de Marathwada, Konkan, Deccan, las colinas Baba Budan de Mysore, Tamil Nadu (Ayurvedic Pharmacopoeia of India, 1ª edición, 1ª parte, vol. 1, pág. 92-93; Gobierno de la India, Ministerio de Salud y Bienestar Familiar, Departamento del Sistema Indio de Medicina y Homeopatía, Nueva Delhi; *The Wealth of India, A Dictionary of Indian Raw Materials and Industrial Products*, Raw Materials, vol. II, Consejo de Investigaciones Científicas e

60

65

Industriales, Delhi; Database on Medicinal Plants Used In Ayurveda, vol 2, Consejo Central de Investigaciones en Ayurveda y Siddha, Departamento del Sistema Indio de Medicina y Homeopatía, Nueva Delhi).

5 La *Cissampelos pareira* Linn es una planta medicinal ayurvédica utilizada tradicionalmente para el tratamiento de una serie de enfermedades. Se describe como amarga, astringente, antihelmíntica, carminativa, estomacal, digestiva, antiinflamatoria, diurética, febrífuga, expectorante, galactogoga y tónico amargo. Es útil en caso de dispepsia, dolor abdominal, diarrea, disentería, fiebre, tos, coriza, asma y trastornos de la lactancia (Base de datos de plantas medicinales utilizadas en Ayurveda ("Database on Medicinal Plants Used In Ayurveda"), vol. 2, Consejo Central de Investigaciones en Ayurveda y Siddha, Departamento del Sistema Indio de Medicina y Homeopatía, Nueva Delhi).

15 La fiebre del dengue no figura como tal en los tratados ayurvédicos clásicos; sin embargo, en dichos tratados se han enumerado muchos tipos de "Jwara" con sus signos y síntomas. A menudo resulta difícil correlacionar un tipo de "Jwara" como homólogo de un tipo concreto de "fiebre" de los mencionados en la medicina contemporánea. En los tratados ayurvédicos clásicos, algunos de los signos y síntomas de la fiebre del dengue se correlacionan con un tipo de fiebre conocida como "Vata-Pittaja Jwara". Se seleccionaron las plantas mencionadas como útiles en el trastorno conocido como "Vata-Pittaja Jwara", "Vataj Jwara" y "Pittaj Jwara" en los tratados ayurvédicos clásicos y se estudiaron sus atributos ayurvédicos, que, a grandes rasgos, corresponden a los encabezamientos "Rasa"; "Guna"; "Veerya"; "Vipaaka"; y "Dosha-Karma". Se estudiaron a fondo todos estos atributos para cada una de las plantas y se desarrolló una hipótesis según la cual se postuló que cualquier hierba que presente, como mínimo, Tikta y/o Kashaya Rasa, Laghu y/o Tikshna Guna, Ushna o Sheeta Veerya, que tenga Katu Vipaaka y Vata y/o Pitta Shaamaka es útil en el alivio de los signos y síntomas que se correlacionan con la fiebre del dengue. Algunos de los atributos, concretamente Katu Rasa y Ruksha Guna, se sumaron a los atributos propuestos en la hipótesis. Por consiguiente, a partir de las hipótesis propuestas y la presencia de los atributos ayurvédicos propuestos y adicionales, la *Cissampelos pareira* Linn (Ambasthaki/Patha) se seleccionó con el fin de estudiar su efecto terapéutico en la fiebre del dengue.

Características de la invención

30 En un aspecto de la presente invención, se dan a conocer extractos de *Cissampelos pareira* para su utilización en el tratamiento de la infección por el virus del dengue.

35 En otro aspecto de la presente invención, se da a conocer una composición farmacéutica que comprende extracto de *Cissampelos pareira* junto con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables, para su utilización en el tratamiento de la infección por el virus del dengue.

En la siguiente descripción se exponen con detalle una o más realizaciones de la presente invención. Otras características, objetivos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción.

Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un diagrama de flujo del proceso de fraccionamiento guiado por bioensayo.

45 La figura 2 muestra la actividad contra el dengue del extracto metanólico de *C. pareira* contra el serotipo 3 del dengue (Den-3) determinada mediante ensayo de reducción de título vírico.

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención da a conocer extractos de *Cissampelos pareira* que presentan actividad contra el dengue.

55 Se da a conocer un planteamiento de fraccionamiento guiado por bioensayo para el material vegetal que conduce a la identificación de extractos y fracciones activos. El procedimiento incluye la preparación de diferentes extractos de *Cissampelos pareira* y la evaluación de la bioactividad en dichos extractos (examen primario: ensayo convencional de neutralización por reducción de placas (PRNT); examen secundario: ensayo modificado de neutralización por reducción de placas (PRNT); y examen terciario: ensayo de reducción de título vírico). A continuación, los extractos activos se someten a fraccionamiento con uno o más disolventes y se evalúa la bioactividad de cada fracción.

60 El uno o más disolventes utilizados para la extracción pueden ser, por ejemplo, agua; alcoholes, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol o butanol; cetonas, por ejemplo, acetona o metil isobutil cetona; ésteres, por ejemplo, acetato de metilo o acetato de etilo; hidrocarburos halogenados, por ejemplo, cloroformo, diclorometano o dicloruro de etileno; fracciones de petróleo, por ejemplo, hexano, éter de petróleo o heptano; o una o más mezclas de los mismos.

65 El uno o más disolventes utilizados para el fraccionamiento pueden ser, por ejemplo, agua; fracciones de petróleo, por ejemplo, hexano, éter de petróleo o heptano; hidrocarburos halogenados, por ejemplo, cloroformo, diclorometano o dicloruro de etileno; ésteres, por ejemplo, acetato de etilo o acetato de metilo; cetonas, por ejemplo, acetona o

metil isobutil cetona; alcoholes, por ejemplo, butanol; éteres, por ejemplo, éter dietílico; o una o más mezclas de los mismos.

5 En otro aspecto de la presente invención, se dan a conocer procedimientos para la preparación de extractos de *Cissampelos pareira*. Dichos procedimientos incluyen la extracción de la masa vegetal de *Cissampelos pareira* con uno o más disolventes de entre la gama de no polares a polares, la concentración del extracto y el secado del extracto, o la extracción de la masa vegetal de *Cissampelos pareira* con uno o más disolventes de entre la gama de no polares a polares, la concentración del extracto, la adición de agua y la partición del extracto con uno o más disolventes de entre la gama de no polares a polares, y el secado del extracto, o la extracción de la masa vegetal de *Cissampelos pareira* con uno o más disolventes de entre la gama de no polares a polares, la concentración del extracto, la extracción del extracto con uno o más disolventes de entre la gama de no polares a polares, y el secado del extracto.

15 Los disolventes para la extracción pueden ser, por ejemplo, agua; alcoholes, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol o butanol; cetonas, por ejemplo, acetona o metil isobutil cetona; ésteres, por ejemplo, acetato de metilo o acetato de etilo; hidrocarburos halogenados, por ejemplo, cloroformo, diclorometano o dicloruro de etileno; fracciones de petróleo, por ejemplo, hexano, éter de petróleo o heptano; o una o más mezclas de los mismos.

20 Los disolventes para la partición pueden ser, por ejemplo, agua; fracciones de petróleo, por ejemplo, hexano, éter de petróleo o heptano; hidrocarburos halogenados, por ejemplo, cloroformo, diclorometano o dicloruro de etileno; ésteres, por ejemplo, acetato de etilo o acetato de metilo; cetonas, por ejemplo, acetona o metil isobutil cetona; alcoholes, por ejemplo, butanol; éteres, por ejemplo, éter dietílico; o una o más mezclas de los mismos.

25 Se dan a conocer composiciones farmacéuticas que comprenden extractos de *Cissampelos pareira* junto con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables, que se pueden administrar a un mamífero para el tratamiento de la infección por virus del dengue por cualquier vía que transporte de forma eficaz el compuesto activo al sitio de acción apropiado o deseado, tales como vía oral, nasal, pulmonar, transdérmica o parenteral (rectal, subcutánea, intravenosa, intrauretral, intramuscular o intranasal). La elección de los vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticos se puede llevar a cabo teniendo en cuenta la vía de administración deseada y la práctica farmacéutica estándar.

30 Los extractos de *Cissampelos pareira* incluyen (a) los extractos obtenidos por extracción de la masa vegetal de *Cissampelos pareira* con uno o más disolventes, y (b) las fracciones obtenidas mediante la partición de los extractos de la etapa (a) con uno o más disolventes.

35 La expresión "masa vegetal de *Cissampelos pareira*" se refiere a toda la planta, incluidas sus partes aéreas, por ejemplo, frutas, flores, semillas, hojas, ramas, corteza del tallo, tallo o duramen y raíz.

40 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar algunas realizaciones de la presente invención, pero no pretenden limitar en ningún sentido el alcance de la misma.

Ejemplo 1: Preparación del extracto de metanol

45 Se introdujeron partes aéreas pulverizadas de *Cissampelos pareira* (100 kg) en el extractor. Se introdujo metanol (500 litros) en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujeron 300 litros de metanol en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujeron 300 litros de metanol en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. Los extractos metanólicos se combinaron y se concentraron al máximo a presión reducida y baja temperatura. El extracto se descargó en bandejas de acero inoxidable y se secó en un horno de alto vacío a temperatura ambiente durante un periodo comprendido aproximadamente entre 16 horas y 18 horas.

55 Rendimiento = 6% - 15%

Ejemplo 2: Preparación del extracto (metanol:agua al 50:50)

60 Se introdujeron partes aéreas pulverizadas de *Cissampelos pareira* (100 kg) en el extractor. Se introdujo una mezcla de metanol:agua (250 litros:250 litros) en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujo una mezcla de metanol:agua (150 litros:150 litros) en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujo una mezcla de metanol:agua (150 litros:150 litros) en el

extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. Los extractos hidroalcohólicos se combinaron y se concentraron al máximo a presión reducida y baja temperatura, se descargó el extracto en bandejas de acero inoxidable y se secó en un horno de alto vacío a temperatura ambiente durante un periodo comprendido

5

Rendimiento = 10% - 25%

Ejemplo 3: Preparación del extracto acuoso

10

Se introdujeron partes aéreas pulverizadas de *Cissampelos pareira* (100 kg) en el extractor. Se introdujo agua (500 litros) en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujo agua (300 litros) en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujo agua (300 litros) en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. Los extractos acuosos se combinaron y se concentraron al máximo a presión reducida y baja temperatura, se descargó el extracto en bandejas de acero inoxidable y se secó en un horno de alto vacío a temperatura ambiente durante un periodo comprendido

15

20

Rendimiento = 15% - 30%

Ejemplo 4: Preparación de una fracción de hexano

25

Se introdujeron partes aéreas pulverizadas de *Cissampelos pareira* (100 kg) en el extractor. Se introdujo metanol (500 litros) en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujeron 300 litros de metanol en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujeron 300 litros de metanol en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. Los extractos metanólicos se combinaron y se concentraron al máximo a presión reducida y baja temperatura. El extracto se suspendió en agua (50 litros) y se sometió a partición con hexano (40 litros). La capa de hexano se separó y se recogió en un recipiente. El procedimiento se repitió tres veces más y la capa de hexano combinada se secó sobre un agente secante. Se concentró a presión reducida, se descargó en bandejas de acero inoxidable y se secó en un horno de alto vacío a temperatura ambiente durante un periodo comprendido aproximadamente entre 16 horas y 18 horas.

30

35

40

Rendimiento = 1,0% - 3,0%

Ejemplo 5: Preparación de una fracción de cloroformo

45

Se introdujeron partes aéreas pulverizadas de *Cissampelos pareira* (100 kg) en el extractor. Se introdujo metanol (500 litros) en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujeron 300 litros de metanol en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujeron 300 litros de metanol en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. Los extractos metanólicos se combinaron y se concentraron al máximo a presión reducida y baja temperatura. El extracto se suspendió en agua (50 litros) y se sometió a partición con hexano (40 litros). La capa de hexano se separó y se recogió en un recipiente. El procedimiento se repitió tres veces más y la capa de hexano combinada se secó sobre un agente secante y se concentró. La capa acuosa restante se sometió a partición con cloroformo (40 litros) y la capa de cloroformo se separó y se recogió en un recipiente. El procedimiento se repitió tres veces más y la capa de cloroformo combinada se hizo pasar a través de un agente secante. La capa de cloroformo se concentró a presión reducida, se descargó en bandejas de acero inoxidable y se secó en un horno de alto vacío a temperatura ambiente durante un periodo comprendido aproximadamente entre 16 horas y 18 horas.

50

55

60

Rendimiento = 0,20% - 1,0%

Ejemplo 6: Preparación de una fracción de diclorometano

Se introdujeron partes aéreas pulverizadas de *Cissampelos pareira* (100 kg) en el extractor. Se introdujo metanol (500 litros) en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujeron 300 litros de metanol en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. Los extractos metanólicos se combinaron y se concentraron al máximo a presión reducida y baja temperatura. El extracto se suspendió en agua (50 litros) y se sometió a partición con hexano (40 litros), y la capa de hexano se separó y se recogió en un recipiente. El procedimiento se repitió tres veces más y la capa de hexano combinada se secó sobre un agente secante y se concentró. La capa acuosa se sometió a partición con diclorometano (40 litros) y la capa de diclorometano se separó y se recogió en un recipiente. El procedimiento se repitió tres veces más y la capa de diclorometano combinada se hizo pasar a través de un agente secante. La capa de diclorometano se concentró a presión reducida, se descargó en bandejas de acero inoxidable y se secó en un horno de alto vacío a temperatura ambiente durante un periodo comprendido aproximadamente entre 16 horas y 18 horas.

Rendimiento = 0,22 % - 1,2 %

Ejemplo 7: Preparación de una fracción de diclorometano

Se introdujeron partes aéreas pulverizadas de *Cissampelos pareira* (100 kg) en el extractor. Se introdujo metanol (500 litros) en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujeron 300 litros de metanol en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. Los extractos metanólicos se combinaron y se concentraron al máximo a presión reducida y baja temperatura. El extracto se suspendió en agua (50 litros), se sometió a partición con diclorometano (40 litros) y la capa de diclorometano se separó y se recogió en un recipiente. El procedimiento se repitió tres veces más y la capa de diclorometano combinada se hizo pasar a través de un agente secante. La capa de diclorometano se concentró a presión reducida, se descargó en bandejas de acero inoxidable y se secó en un horno de alto vacío a temperatura ambiente durante un periodo comprendido aproximadamente entre 16 horas y 18 horas.

Rendimiento = 1,0% - 1,75%

Ejemplo 8: Preparación de una fracción de butanol

Se introdujeron partes aéreas pulverizadas de *Cissampelos pareira* (100 kg) en el extractor. Se introdujo metanol (500 litros) en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujeron 300 litros de metanol en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujeron 300 litros de metanol en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. Los extractos metanólicos se combinaron y se concentraron al máximo a presión reducida y baja temperatura. El extracto se suspendió en agua (50 litros) y se sometió a partición con hexano (40 litros), y la capa de hexano se separó y se recogió en un recipiente. El procedimiento se repitió tres veces más y la capa de hexano combinada se secó sobre un agente secante y se concentró. La capa acuosa se sometió a partición con cloroformo (40 litros) y la capa de cloroformo se separó y se recogió en un recipiente. El procedimiento se repitió tres veces más y la capa de diclorometano combinada se hizo pasar a través de un agente secante y se concentró. La capa acuosa se sometió a partición con butanol (40 litros) y la capa de butanol se separó y se recogió en un recipiente. El procedimiento se repitió tres veces más y la capa de butanol combinada se secó sobre un agente secante. La capa de butanol se concentró a presión reducida, se descargó en bandejas de acero inoxidable y se secó en un horno de alto vacío a temperatura ambiente durante un periodo comprendido aproximadamente entre 16 horas y 18 horas.

Rendimiento = 2,0% - 4,5%

Ejemplo 9: Preparación de una fracción acuosa

Se introdujeron partes aéreas pulverizadas de *Cissampelos pareira* (100 kg) en el extractor. Se introdujo metanol (500 litros) en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujeron 200 litros de metanol en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujeron 200 litros de metanol en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. Los extractos metanólicos se combinaron y se concentraron al máximo a presión reducida y baja temperatura. El extracto se suspendió en agua (50 litros) y se sometió a partición con hexano (40 litros), y la capa de hexano se separó y se recogió en un recipiente. El procedimiento se repitió tres veces más y la capa de hexano combinada se secó sobre un agente secante y se concentró. La capa acuosa se sometió a partición con cloroformo (40 litros) y la capa de cloroformo se separó y se recogió en un recipiente. El procedimiento se repitió tres veces más y la capa de cloroformo combinada se hizo pasar a través de un agente secante y se concentró. La capa acuosa se sometió a partición con butanol (40 litros) y la capa de butanol se separó y se recogió en un recipiente. El procedimiento se repitió tres veces más y la capa de butanol combinada se secó sobre un agente secante y se concentró. La capa acuosa agotada se concentró a presión reducida, se descargó en bandejas de acero inoxidable y se secó en un horno de alto vacío a temperatura ambiente durante un periodo comprendido aproximadamente entre 16 horas y 18 horas.

Rendimiento = 2,5% - 6,0%

Ejemplo 10: Preparación de una fracción de acetato de etilo

Se introdujeron partes aéreas pulverizadas de *Cissampelos pareira* (100 kg) en el extractor. Se introdujo metanol (500 litros) en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujeron 300 litros de metanol en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujeron 300 litros de metanol en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. Los extractos metanólicos se combinaron y se concentraron al máximo a presión reducida y baja temperatura. El extracto se suspendió en agua (50 litros) y se sometió a partición con acetato de etilo (40 litros), y la capa de acetato de etilo se separó y se recogió en un recipiente. El procedimiento se repitió tres veces más y la capa de acetato de etilo combinada se secó sobre un agente secante. La capa de acetato de etilo se concentró a presión reducida, se descargó en bandejas de acero inoxidable y se secó en un horno de alto vacío a temperatura ambiente durante un periodo comprendido aproximadamente entre 16 horas y 18 horas.

Rendimiento = 2,0% - 4,0%

Ejemplo 11: Preparación de una fracción de acetona

Se introdujeron partes aéreas pulverizadas de *Cissampelos pareira* (100 kg) en el extractor. Se introdujo metanol (500 litros) en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujeron 300 litros de metanol en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. Nuevamente, se introdujeron 300 litros de metanol en el extractor y se llevó a cabo una extracción a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante aproximadamente 16 horas. Los extractos metanólicos se combinaron y se concentraron al máximo a presión reducida y baja temperatura. El extracto se extrajo con acetona (50 litros) a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y el punto de ebullición del disolvente durante un periodo comprendido aproximadamente entre 2 horas y 3 horas. El extracto se filtró y se almacenó en un recipiente. El procedimiento se repitió tres veces más. El extracto se descargó en bandejas de acero inoxidable y se secó en un horno de alto vacío a temperatura ambiente durante un periodo comprendido aproximadamente entre 16 horas y 18 horas.

Rendimiento = 2,0% - 3,5%

Ejemplo 12 Actividad biológica(i) Examen primario: ensayo convencional de neutralización por reducción de placas (PRNT)

5 Se evaluó la actividad antiviral de los extractos mediante el ensayo PRNT (Khanam y otros, Am. J. Trop. Med. Hyg.,
74(2) pág. 266-277 (2006). Se sembraron células LLCMK2 (línea celular de riñón de mono) en formato de 24 pocillos
a una concentración de 1×10^5 /pocillo. La infección se realizó con aproximadamente 50 unidades formadoras de
placas (PFU) de virus del dengue (DENV) (los cuatro serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) a una
10 multiplicidad de infección (MOI) de 1. Los virus se preincubaron por separado con un volumen idéntico de extractos
comprendido dentro del intervalo 100-0,33 mcg/ml. Tras una preincubación de una noche a 4°C, los virus/extractos
se diluyeron hasta un volumen final de 200 μ l con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) más un 2% de
suero de ternera fetal (Δ FCS) inactivado por calor y se utilizaron para infectar un único pocillo de una placa de 24
pocillos. Cada dilución se sometió a ensayo en pocillos por duplicado y la mezcla de preincubación virus/extracto se
15 preparó como mezcla madre suficiente para dos pocillos. Tras la adsorción durante dos horas, el inóculo se extrajo
por aspiración y las células se cubrieron con metilcelulosa al 1,25% en DMEM más el 6% de Δ FCS (1 ml/pocillo). Se
establecieron controles apropiados en paralelo con pocillos de control negativo (falso: no infectado) que recibieron
200 μ l de DMEM más el 2% de Δ FCS y pocillos de control positivo que recibieron (virus DEN-1, 2, 3 y 4 por
separado), preincubados con DMEM más el 2% de Δ FCS en lugar de extractos. Las placas se incubaron a 37°C en
un incubador humidificado con un 5% de CO₂. El día 6 después de la infección, las células se fijaron con 1 ml de
20 solución de formaldehído al 4% a temperatura ambiente durante dos horas. Los pocillos se lavaron con agua
corriente y se tiñeron con stock diluido a razón de 1:40 de solución de cristal violeta al 2% en un 20% de etanol
durante 30 minutos. Se contaron las placas visibles tras la tinción y la dilución de extracto que dio lugar a una
reducción del 50% del recuento de placas (con respecto al número de placas generadas por el virus en ausencia de
extracto) se expresó como valor de PRNT₅₀.

25 El extracto metanólico mostró actividad contra los cuatro serotipos del dengue en el ensayo convencional con
valores de PRNT₅₀ comprendidos dentro del intervalo 1,2-11,1 mcg/ml. Los valores de PRNT₅₀ de los extractos
hidroalcohólicos y acuosos en el ensayo convencional para todos los serotipos fueron > 100 mcg/ml.

30 (ii) Examen secundario: ensayo modificado de neutralización por reducción de placas (PRNT)

Se sembraron células LLCMK2 en formato de 24 pocillos a una concentración de 1×10^5 /pocillo. Las células
sembradas se infectaron con aproximadamente 50 μ l de virus con 50 (1X) unidades formadoras de placas (PFU) de
los 4 serotipos a una MOI de 1. Tras la adsorción durante dos horas a 37°C y un 5% de CO₂, se aspiró el inóculo.
35 Los pocillos se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y las células infectadas se expusieron a diferentes
concentraciones de extractos (200 - 0,82 mcg/ml) durante un periodo de 24 horas. Después de 24 horas de
incubación a 37°C y un 5% de CO₂, el extracto se extrajo por aspiración y las células se cubrieron con metilcelulosa
al 1% en DMEM más un 6% de Δ FCS (1 ml/pocillo). Cada dilución se sometió a ensayo en pocillos por duplicado.
Las placas se incubaron a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO₂ durante 6 días. El día 6 después
40 de la infección, la capa de recubrimiento se decantó con cuidado y las células se fijaron con 1 ml de solución de
formaldehído al 4% a temperatura ambiente durante una hora. Los pocillos se lavaron con agua corriente y se
tiñeron con stock diluido al 1:40 de solución de cristal violeta al 2% en un 20% de etanol durante 30 minutos. Se
contaron las placas visibles tras la tinción y la dilución de extracto que dio lugar a una reducción del 50% del
recuento de placas (con respecto al número de placas generadas por el virus en ausencia de extracto) se expresó
45 como valor de PRNT₅₀.

El extracto metanólico mostró valores de PRNT₅₀ comprendidos dentro del intervalo 78-125 mcg/ml en el ensayo
modificado para los cuatro serotipos. Sin embargo, los extractos hidroalcohólicos y acuosos fueron inactivos hasta
50 200 mcg/ml.

(iii) Examen terciario: ensayo de reducción de título vírico

El ensayo de reducción de título vírico se realizó según Puig-Basagoiti y otros, Antimic. Agents and Chemotherapy,
50(4) pág. 1320-1329 (2006). Se sembraron células Vero en formato de 24 pocillos a una concentración de $1 \times$
10⁵/pocillo. Las células sembradas se infectaron con aproximadamente 50 μ l de virus con 50 (1X) unidades
formadoras de placas (PFU) de los 4 serotipos a una MOI de 1. Tras la adsorción durante dos horas a 37°C y un 5%
de CO₂, se aspiró el inóculo. Los pocillos se lavaron con PBS y las células infectadas se expusieron a medio de
crecimiento (DMEM más el 2% de Δ FCS) con diferentes concentraciones de extractos (200 - 0,82 mcg/ml),
recibiendo además los pocillos de control negativo (falso: no infectado) DMEM más el 2% de Δ FCS y recibiendo los
60 pocillos de control positivo virus DEN-3 durante un periodo de 9 días. se extrajeron muestras de 20 μ l de
sobrenadante a diferentes días de intervalo, concretamente al cabo de 0, 3, 6 y 9 días, y se congelaron hasta su
procesamiento posterior.

Las muestras alícuotas se diluyeron en serie en medio DMEM más el 2% de Δ FCS antes de su adición a los pocillos
que contenían células confluentes (por duplicado o triplicado). Se dejaron adsorber los virus durante dos horas y a
65 continuación se lavó con tampón fosfato salino. Tras la adsorción durante dos horas, el inóculo se extrajo por

5 aspiración y las células se cubrieron con metilcelulosa al 1,25% en DMEM más el 6% de Δ FCS (1 ml/pocillo). Las placas se incubaron a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO₂ durante 6 días. El día 6 después de la infección, la capa de recubrimiento se decantó con cuidado y las células se fijaron con 1 ml de solución de formaldehído al 4% a temperatura ambiente durante una hora. Los pocillos se lavaron con agua corriente y se tiñeron con stock diluido al 1:40 de solución de cristal violeta al 2% en un 20% de etanol durante 30 minutos. Se contaron las placas visibles tras la tinción y se calcularon la reducción logarítmica en el título de placa en diferentes puntos temporales para diferentes concentraciones de ensayo en comparación con el control de virus.

10 El perfil cinético de destrucción del extracto metanólico indicó una reducción logarítmica de 2 en el día 3 para 66,66 mcg/ml frente al serotipo Den-3. En el día 6, para una concentración de extracto de 2,46 y 7,4 mcg/ml, la carga viral se redujo en 1-1,5 a escala logarítmica.

(iv) Ensayos de citotoxicidad

15 La citotoxicidad del extracto metanólico se evaluó incubando células HepG-2 (línea celular de hepatoma de hígado humano) con una dilución de seis puntos de extracto (intervalo de concentración de 200 mcg/ml - 0,82 mcg/ml) en medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute) con el 2% de Δ FCS en placas de 96 pocillos durante 3 días, correspondientes al periodo de incubación de las células con extractos en los exámenes primario y secundario. Al
20 cabo de 72 horas, se midió la viabilidad celular mediante el metabolismo celular de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) (Markland W. y otros Antimic. Agents and Chemotherapy, 44(4) pág. 859-866 (2000)). Se determinó un índice de crecimiento (IC) 50 de 90 mcg/ml.

REIVINDICACIONES

1. Extracto de *Cissampelos pareira* para su utilización en el tratamiento de la infección por el virus del dengue.
- 5 2. Extracto para su utilización, según la reivindicación 1, en el que dicho extracto es un extracto de metanol, metanol:agua (50:50) o un extracto acuoso.
3. Extracto para su utilización, según la reivindicación 2, que se selecciona a partir de una fracción de extracto de metanol.
- 10 4. Composición farmacéutica que comprende un extracto de *Cissampelos pareira* junto con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables para su utilización en el tratamiento de la infección por el virus del dengue.
- 15 5. Extracto de *Cissampelos pareira* para su utilización en el tratamiento de la infección por el virus del dengue, según la reivindicación 1, que se prepara por un procedimiento que comprende:
- (a) la extracción de la masa vegetal de *Cissampelos pareira* con uno o más disolventes seleccionados entre agua, alcoholes, cetonas, ésteres, hidrocarburos halogenados, fracciones de petróleo y una mezcla de los mismos,
- 20 (b) la concentración del extracto, y
- (c) el secado del extracto.
- 25 6. Extracto para su utilización, según la reivindicación 5, en el que el procedimiento comprende además:
- (d) la adición de agua tras la etapa (b), y
- (e) la partición de la mezcla obtenida en la etapa (d).
- 30 7. Extracto para su utilización, según la reivindicación 5, en el que el procedimiento comprende además:
- (f) la extracción del residuo concentrado obtenido tras la etapa (b) con uno o más disolventes seleccionados entre agua, alcoholes, cetonas, ésteres, hidrocarburos halogenados, fracciones de petróleo y una mezcla de los mismos.
- 35 8. Extracto para su utilización, según la reivindicación 5, 6 ó 7, en el que el alcohol se selecciona entre el grupo formado por metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol y mezclas de los mismos, la cetona se selecciona entre el grupo formado por acetona, metil isobutil cetona y mezclas de los mismos, el éster se selecciona entre el grupo formado por acetato de metilo, acetato de etilo y mezclas de los mismos, el hidrocarburo halogenado se selecciona entre el grupo formado por cloroformo, diclorometano, dicloruro de etileno y mezclas de los mismos, el éter es éter dietílico y la fracción de petróleo se selecciona entre el grupo formado por hexano, éter de petróleo, heptano y mezclas de los mismos.
- 40

FIGURA 1

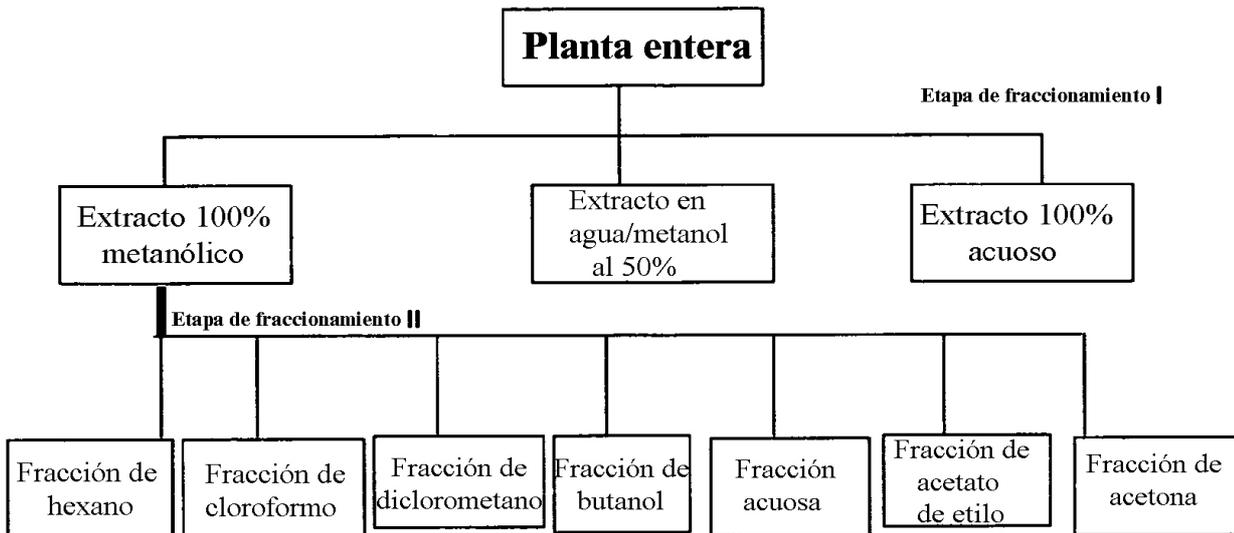


FIGURA 2

