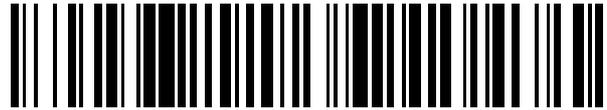


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 783**

51 Int. Cl.:

A61K 36/185 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2009** **E 09759905 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013** **EP 2373323**

54 Título: **Extracto acuoso de Ribes para el tratamiento de infecciones virales**

30 Prioridad:

12.12.2008 EP 08021663

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

25.10.2013

73 Titular/es:

**PANDALIS, GEORGIOS (100.0%)
Füchtenweg 3
49219 Glandorf, DE**

72 Inventor/es:

PANDALIS, GEORGIOS

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 426 783 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

Extracto acuoso de Ribes para el tratamiento de infecciones virales.

La presente invención se refiere a una composición que comprende un extracto del género *Ribes* para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones virales.

5 Un gran número de enfermedades humanas están provocadas por virus e incluyen influenza, el resfriado común, varicela y úlceras bucales. También son transmitidas por virus enfermedades como SIDA, hepatitis, infecciones por herpes, infecciones por Coxsackie, sarampión, rubeola, citomegalia, paperas, rabies, diarrea, SRAG, Ébola, fiebre amarilla, Fiebre del Nilo occidental, fiebre de Hanta, dengue, fiebre de Marburgo, fiebre de Lassa, viruela, infecciones virales por papiloma humano, mononucleosis infecciosa, linfoma de Burkitt, poliomieltitis, encefalitis, adenofaringitis.

10 Sin embargo, las infecciones virales más comunes en seres humanos son la influenza y enfermedades de resfriado común. Cada año aproximadamente del 10 al 20% de la población mundial se pone enfermo debido a influenza, y las enfermedades de resfriado común son la infección más frecuente de los seres humanos en general. Habitualmente los adultos se ven afectados de dos a tres veces al año, los niños incluso más. Esto conduce a una gran pérdida desde el punto de vista económico, puesto que las personas han de obtener un tratamiento y habitualmente no pueden ir a trabajar durante la infección. Además, el tratamiento convencional de influenza y enfermedades de resfriado común acarrea un gran coste y muestra efectos secundarios, que pueden ser graves.

15 La influenza, también conocida como gripe, es una infección viral contagiosa que se propaga por todo el mundo en epidemias estacionales. Se distinguen tres tipos de virus, A, B y C. B y C se restringen a los seres humanos, mientras que el tipo A se extiende a mamíferos y aves.

20 La Organización Mundial de la Salud, OMS, alerta de una pandemia de influenza global en los años venideros. Las epidemias y pandemias están provocadas principalmente por el virus influenza de tipo A. Importantes cambios genéticos del material genético de virus influenza han provocado tres pandemias en el siglo XX, cuyos agentes infecciosos eran todos tipo A.

25 En la actualidad, la gripe aviar, también un virus de tipo A, representa un peligro particular de pandemia. Ha aparecido cada vez más en los últimos años, particularmente en el Sudeste asiático. Su propagación se ve ayudada por aves silvestres, que sirven como resistentes portadores 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 cuando se infectan simultáneamente cerdos o seres humanos 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 los seres humanos sólo ha tenido lugar localmente. Sin embargo, no se observó la transmisión de la gripe aviar entre seres humanos.

30 La vacunación representa el medio más importante de prevención de una enfermedad viral. Sin embargo, en el contexto de la prevención, la vacunación depende de la preparación de una vacuna contra un determinado virus. Esto requiere que el virus debe existir ya. Esto, y el largo tiempo requerido para el desarrollo de una vacuna (aproximadamente 4 meses), conduce a una restricción sustancial en su uso en una pandemia global. En tal caso, el uso de vacunas sólo se garantiza por el uso previo y paralelo de agentes antivirales (WHO Guidelines on the Use of Vaccines and Antivirals during Influenza Pandemics (Directrices de la OMS sobre el uso de vacunas y antivirales durante pandemias de influenza); Organización Mundial de la Salud 2004).

35 Los agentes antivirales que son eficaces en el tratamiento de influenza incluyen amantadina, rimantadina, zanamivir y oseltamivir y ribavirina. Todos los medicamentos enumerados tienen efectos secundarios que, en algunos casos, pueden ser graves. Por ejemplo, oseltamivir, que se vende con el nombre Tamiflu®, muestra los efectos secundarios frecuentes de náuseas, vómitos y dolor de estómago. Su uso está indicado sólo a partir de 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 por debajo de ese límite de edad.

40 Los medicamentos antivirales son eficaces en la profilaxis de una enfermedad viral así como en su tratamiento. Hasta ahora, no ha sido satisfactoria la curación médica directa de una enfermedad viral.

45 Se conoce un extracto de saúco por su efecto de acortamiento de la duración de influenza en determinadas 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).

50 El documento WO-A-99/44578 describe el uso de isoquercetina, un flavonoide natural, en formulaciones médicas como filtro de protección solar y sustancia antiviral. En particular, la isoquercetina, que está presente por ejemplo en *Ribes nigrum* L se describe como que muestra actividad antiviral contra el virus del herpes simple de tipo I. Sin embargo, no se ha demostrado ni la preparación de un extracto de *Ribes nigrum* L. ni un efecto particular de la actividad antiviral de un extracto de este tipo de *Ribes nigrum* L.

Además, el documento JP-A-2001-328941 da a conocer antocianinas aisladas de extractos de *Ribes nigrum* L. se describe que dichas antocianinas muestran actividad antiviral contra influenza A o influenza B. Sin embargo, sólo se han estudiado antocianinas puras aisladas de extractos de *Ribes nigrum* L en vista de su actividad frente a influenza A humana; no se ha examinado la actividad del propio extracto.

5 Como medida preventiva para el caso de una pandemia inminente que podría estar provocada por la gripe aviar, los países de la comunidad mundial cuentan con medicamentos antivirales. Por ejemplo, se encargó el medicamento oseltamivir mencionado anteriormente (Tamiflu®; Hoffman La Roche) en cantidades significativas por algunos países 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 su producción.

10 Además, el uso de agentes antivirales (conocidos) representa cada vez más un riesgo por el hecho de que éstos 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 una 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 determinados grupos de edad, tales como por ejemplo el oseltamivir (Tamiflu®), que sólo puede usarse a partir de 13 años de edad.

Además de influenza, otra infección viral típica son las enfermedades de resfriado común. Están incluidas entre las enfermedades de resfriado común típicas infecciones de las vías respiratorias, tales como resfriados de cabeza e inflamaciones de las amígdalas y la faringe, así como toses y bronquitis. Habitualmente, éstas se producen una después de otra, pero el resfriado también puede permanecer restringido a la nariz, la garganta o los bronquios. Las enfermedades de resfriado común de esta clase también se denominan “resfriados virales”. Éstos no han de confundirse con la influenza producida por el virus influenza, lo que muestra un progreso considerablemente más largo y más grave de la enfermedad y se asocia, como norma, con fiebre.

20 Las enfermedades de resfriado común mencionadas también están provocadas por virus. Debido a que hay, por ejemplo, más de cien tipos diferentes de virus que pueden provocar un resfriado de cabeza, apenas será posible desarrollar una vacuna contra el mismo. El tratamiento de resfriados de cabeza o resfriados en general se dirige, por tanto, al alivio de los síntomas. Habitualmente, se usan remedios caseros de eficacia probada en estos casos. Por ejemplo, la inhalación de vapor caliente puede ayudar a una gran congestión nasal. Permite que disminuya la hinchazón en la mucosa nasal y fomenta la eliminación de mucosidad. Esto puede verse ayudado, por ejemplo, por la adición de unas cuantas gotas de aceite del árbol del té o aceite de manzanilla en el agua caliente. También se conoce que el enjuague rutinario de la nariz con una solución salina puede reducir la propensión a resfriados de cabeza.

25 Además de las medidas de autoayuda, los medicamentos pueden ayudar a constreñir los vasos en la mucosa nasal hinchada, conduciendo a un efecto calmante de la mucosa nasal. Sin embargo las gotas nasales para reducir la hinchazón de la mucosa nasal no deben usarse más de dos o tres días. Después de este tiempo, es posible que cuando se suspendan las gotas, la mucosa nasal se hinchará aún más, y se desarrolla “hinchazón de rebote” (rinitis medicamentosa).

30 A diferencia de los espráis nasales sintéticos químicos, los productos fitofarmacéuticos tienen pocos efectos secundarios. Incluso si se usan a lo largo de un periodo de tiempo más largo, no dañan la mucosa nasal y no conducen a rinitis medicamentosa. Cuanto antes se apliquen los productos fitofarmacéuticos, más eficaces son. Pueden usarse ya para soporte en los primeros signos de resfriado. Contrarrestan la propagación de la infección.

35 Por ejemplo, a menudo se toma preparaciones de equinácea para enfermedades de resfriado común, mediante lo cual están en el mercado un gran número de diversos medicamentos en composiciones fitoquímicas. Sin embargo sólo existen estudios controlados sobre la eficacia de estos agentes fitofarmacéuticos en un grado limitado, y con resultados contradictorios. Justo recientemente, sin embargo, un nuevo estudio reveló que la equinácea no tiene la eficacia postulada. El estudio se llevó a cabo con tres preparaciones de equinácea con diversos perfiles fitoquímicos, mediante lo cual se adquirieron estas preparaciones mediante la extracción de raíces de *E. angustifolia* con dióxido de carbono, etanol al 60% o etanol al 20%. El total de 437 voluntarios con infecciones por rinovirus que tomaron parte en este estudio recibieron el medicamento o bien como una profilaxis siete días antes de la exposición al virus o bien para tratamiento en el momento de la exposición. El estudio incluyó un grupo control que recibió placebos. No hubo ninguna diferencia significativa entre los tres extractos de equinácea y el placebo con respecto a la tasa de infección, la intensidad de los síntomas, el volumen de la secreción nasal, el nivel de leucocitos, la concentración de interleucina-8 en el agua de ducha nasal o títulos virales cuantitativos (Deutsches Arzteblatt 102, Número 48 del 2 de diciembre de 2005, páginas A-3341 / B-2822 / C-2640 y the New England Journal of Medicine, 2005, 353, 341-348).

40 Un medicamento adicional de base botánica es un extracto de las raíces de *Pelargonium reniforme* o *sidoides*, que se comercializa con el nombre Umckaloabo®. Umckaloabo® se usa tradicionalmente no sólo para dolencias de las vías respiratorias, sino también para dolencias gastrointestinales. Actualmente se considera que los componentes que determinan la eficacia son varios componentes antibacterianos e inmunomoduladores, tales como cumarinas y taninos. Se postula que el extracto desarrolla efectos gastrointestinales, antivirales y secretolíticos, mediante lo cual

el medicamento no debe usarse por mujeres embarazadas o en periodo de lactancia, o por pacientes con enfermedades hepáticas o renales o un aumento de la tendencia a la hemorragia, porque aún no ha sido posible recopilar una experiencia suficiente en esta área. Además, Umckaloabo® es bastante costoso en comparación con otros productos fitofarmacéuticos.

5 Otras enfermedades graves están provocadas por retrovirus.

Un retrovirus es un virus de ARN que usa la enzima transcriptasa inversa para producir ADN a partir de su genoma de ARN. La transcriptasa inversa es una enzima ADN polimerasa que transcribe ARN monocatenario para dar ADN monocatenario. Además, la transcriptasa inversa ayuda en la formación de un ADN de doble hélice una vez que el ARN se ha sometido a transcripción inversa para dar un ADN monocatenario. El ADN así formado del virus se incorpora entonces en el genoma de los huéspedes mediante una enzima integrasa y se replica con el mismo. Los retrovirus son virus con envuelta que pertenecen a la familia de *Retroviridae* y pueden dividirse en retrovirus endógenos y exógenos.

Un retrovirus endógeno está presente como un elemento genético en el ADN cromosómico. Se deriva de antiguas infecciones virales en los seres humanos, mamíferos y otros vertebrados y se pasa a la siguiente generación y permanece en el genoma. Se sospecha que los retrovirus endógenos humanos desempeñan un papel en algunas enfermedades autoinmunitarias, en particular la esclerosis múltiple.

Los retrovirus exógenos son virus que contienen ARN infecciosos transmitidos de manera horizontal que se transmiten de un animal a otro o de una persona a otra. La transmisión horizontal se produce casi exclusivamente mediante líquidos corporales, la transmisión mediante infecciones de frotis es extremadamente rara y la transmisión por aire puede excluirse. Enfermedades inducidas por o asociadas con retrovirus exógenos son, por ejemplo, leucemia o sarcomas de felinos, leucemia o sarcomas de la gallina, leucemia o sarcomas del ratón, anemia infecciosa equina, leucemia bovina, artritis-encefalitis caprina, leucemia humana de células T de adulto, paraparesia espástica tropical humana y SIDA.

Sin embargo, una de las infecciones virales más graves en los seres humanos es una infección por VIH (virus de la inmunodeficiencia humana). La infección por VIH en los seres humanos se ha vuelto pandémica. La mayoría de los individuos infectados por VIH desarrollan eventualmente SIDA, un estado en los seres humanos en el que el sistema inmunitario comienza a fallar, conduciendo a infecciones oportunistas potencialmente mortales. Desde 1981, cuando se reconoció por primera vez, el SIDA ha producido la muerte de más de 25 millones de personas. En 2007, se creía que entre 30,6 y 36,1 millones de personas vivían con VIH, aproximadamente 2,1 millones de personas murieron y se notificaron 2,5 millones de nuevas infecciones. En África, que tiene la mayor prevalencia de VIH, la esperanza de vida promedio es de aproximadamente 6,5 años menos de lo que sería sin la enfermedad. Esto conduce a una gran pérdida económica y a un aumento de la pobreza.

Una infección por VIH puede dividirse en cuatro estadios: infección primaria, estado clínicamente asintomático, infección por VIH sintomática y progresión de VIH a SIDA.

El primer estadio de la infección, la infección primaria por VIH, dura unas cuantas semanas y puede incluir síntomas pseudogripales. En este estadio, el sistema inmunitario comienza a producir anticuerpos contra VIH y linfocitos citotóxicos debido a una gran cantidad de VIH en la sangre periférica.

En el estadio 2, el estadio clínicamente asintomático o estado de latencia, se reduce el número de partículas virales en la sangre periférica mediante una fuerte defensa inmunitaria. Dicho estadio dura aproximadamente 10 años y está libre de los síntomas principales. Sin embargo, el VIH es activo en los ganglios linfáticos y las personas siguen infectadas.

El estadio 3 de la infección, la infección por VIH sintomática, caracteriza el estadio en el que el sistema inmunitario se vuelve sumamente dañado por el VIH. Los ganglios linfáticos y los tejidos se dañan debido a los años de actividad, el VIH muta y se vuelve más patógeno, conduciendo a un mayor número de destrucción de células T cooperadoras, y el cuerpo infectado comienza a no poder mantener la sustitución de las células T cooperadoras que se pierden. Debido a la disminución de los números de células T cooperadoras, se pierde la inmunidad mediada por células y aparece una variedad de infecciones oportunistas. Este estadio conduce eventualmente al estadio 4 de la infección, concretamente la progresión de VIH a SIDA.

La vacunación representa el medio más importante de prevención de la enfermedad viral. Sin embargo, actualmente no se dispone de ninguna vacuna o cura para la infección por VIH.

Generalmente, las infecciones provocadas por retrovirus se tratan con fármacos antirretrovirales. Las infecciones por VIH se tratan actualmente mediante terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA). Dicha terapia es una combinación de al menos tres fármacos diferentes que pertenecen a al menos dos clases de agentes antirretrovirales. Si sólo se tomase un fármaco, el VIH se volvería resistente a dicho fármaco. Tomando varios fármacos antirretrovirales al mismo tiempo se reduce la tasa de desarrollo de resistencia, haciendo que el tratamiento sea más eficaz a largo plazo. Actualmente, se dispone de más de 20 fármacos antirretrovirales aprobados divididos en 5 grupos. Cada uno de estos grupos ataca al VIH de diferente manera. Un primer grupo de

agentes antirretrovirales son los inhibidores nucleosídicos/nucleotídicos de la transcriptasa inversa (INTI). Dichos inhibidores interfieren con la proteína transcriptasa inversa que se requiere para que el virus haga nuevas copias de sí mismo. Un segundo grupo de compuestos son los inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INNTI), que dificultan la replicación del VIH inhibiendo la proteína transcriptasa inversa. Un tercer grupo de agentes antirretrovirales son inhibidores de proteasas (IP). Dichos agentes inhiben la proteasa, que se requiere en el proceso de replicación del VIH. Una cuarta clase de fármacos son inhibidores de fusión o entrada, que impiden que el VIH se una a o entre en células inmunitarias humanas. Dichos fármacos se usan particularmente para pacientes que se infectan con virus ya resistentes a las terapias comunes. Una quinta clase de inhibidores son inhibidores de integrasa que interfieren con la integrasa. Dicha enzima es necesaria para que el virus inserte su material genético en células humanas.

La terapia antirretroviral de gran actividad no cura al paciente, pero mejora la salud general y la calidad de vida de pacientes infectados por VIH. La esperanza de vida promedio de una persona infectada por VIH es ahora de aproximadamente 32 años desde el momento de la infección. En ausencia de TARGA, las progresiones de la infección por VIH a SIDA se producen habitualmente después de 9 a 10 años y la mediana del tiempo de supervivencia tras el desarrollo de SIDA es de sólo 9 meses. El desarrollo de TARGA como terapia eficaz para la infección por VIH ha reducido sustancialmente la tasa de mortalidad en aquellas zonas en las que los fármacos están ampliamente disponibles.

La combinación farmacológica más común en la terapia antirretroviral de gran actividad consiste en dos INTI combinados con o bien un INNTI o bien un inhibidor de proteasa. De la manera más común, se usa ritonavir como el inhibidor de proteasa. Un ejemplo de una combinación de fármacos antirretrovirales contiene dos INTI, concretamente zidovudina y lamivudina, en combinación con el INNTI efavirenz. INTI usados comúnmente son lamivudina, abacavir, zidovudina, estavudina, zalcitabina, didanosina, emtricitabina y tenofovir. INNTI usados normalmente son delavirdina, efavirenz, etravirina y nevirapina. Inhibidores de proteasa convencionales son amprenavir, fosamprenavir, atazanavir, darunavir, indinavir, lopinavir, ritonavir, nelfinavir, saquinavir y tipranavir. Como inhibidores de fusión o entrada, se usan normalmente enfuvirtida y maraviroc. Un inhibidor de integrasa usado comúnmente es raltegravir.

Sin embargo, a veces los pacientes muestran una intolerancia a la medicación y la terapia antirretroviral de gran actividad provoca, en algunos casos, efectos secundarios graves, que pueden ser incluso potencialmente mortales en casos poco frecuentes. Además, el no cumplimiento y la no persistencia son los motivos principales para una terapia fracasada. Los motivos para el no cumplimiento y la no persistencia son los problemas psicosociales, por ejemplo escaso acceso a asistencia médica, apoyo social inadecuado, enfermedad psiquiátrica y drogadicción. Además, los regímenes son muy complejos, requiriendo un gran número de pastillas, una frecuencia de dosificación específica, restricciones en las comidas y otros asuntos. Los efectos secundarios típicos que se producen en la terapia son lipodistrofia, dislipidemia, resistencia a la insulina, un aumento en los riesgos cardiovasculares y malformaciones congénitas. Efectos secundarios adicionales que se producen durante el tratamiento con fármacos antirretrovirales son diarrea, náuseas, vómitos, exantema, reacciones de hipersensibilidad, inapetencia, efectos sobre el sistema nervioso central, tales como mareo, cambios del estado de ánimo, depresión, ansiedad y paranoia, fatigue, insomnio, daño renal, daño hepático, daño pancreático, acidosis láctica y daño a los nervios. Dichos efectos secundarios pueden tener un importante impacto sobre la salud o la calidad de vida.

Además, los fármacos antirretrovirales son caros y la mayoría de los individuos infectados no tienen acceso a los medicamentos y tratamientos para VIH y SIDA. Por ejemplo, los inhibidores de fusión y entrada, así como los inhibidores de integrasa sólo están disponibles en países con abundantes recursos.

El documento US-A-2005/0266104 se refiere a la extracción y la purificación de compuestos flavonoides a partir de material vegetal. Tabart *et al.*, Food Chemistry 2007, 105, 1268 a 1275 estudiaron la extracción de componentes fenólicos y antioxidantes de hojas de grosella negra. Knox *et al.*, Acta virologica 2001, 45, 209 a 215 describen la actividad antiviral de frutos de *Ribes nigrum* frente a influenza A y B. Tabart *et al.*, J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 6271 a 6276 describen las propiedades antioxidantes de flavonoides aislados de grosella negra. Knox *et al.*, Phytotherapy Research 2003, 17, 120 a 122 estudiaron una actividad anti-virus influenza de extractos en bruto de *Ribes nigrum*. Suzutani *et al.*, Phytotherapy Research 2003, 17, 609 a 613 describen una actividad anti-herpes de un extracto de *Ribes nigrum*. Middleton *et al.*, Pharmacological Reviews 2000, 52, 673 a 751 describen el efecto antiviral de flavonoides que se producen de manera natural. Brinkworth *et al.*, Biochemical and Biophysical Research Communications 1992, 188 (2), 631 a 637 estudiaron compuestos flavonoides que tienen actividad antiviral frente a VIH. Korovka *et al.*, FSTA Abstract 77-3-05-a0336 determinaron el contenido en ácido ascórbico en plantas silvestres.

Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar el uso de una composición antiviral para la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones virales, que pueda prepararse de manera económica y que no provoque efectos secundarios en absoluto o sólo efectos secundarios menores cuando se administra.

Este objeto se logra mediante una composición para el uso en la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones virales, en la que la composición comprende un extracto acuoso de al menos una de las partes aéreas de plantas del género *Ribes*, en la que se seleccionan las partes aéreas del grupo que consiste en hojas y ramas.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra los resultados de la actividad antiviral de un extracto de las ramas y las hojas de *Ribes nigrum* frente a virus de influenza A, A/Puerto-Rico/8/34 (H1N1) (PR8) (humano).

5 La figura 2 muestra los resultados de la actividad antiviral de un extracto de las ramas y las hojas de *Ribes nigrum* y de T20 frente a VIH-1.

La figura 3 muestra los resultados del ensayo de citotoxicidad de un extracto de las ramas y las hojas de *Ribes nigrum* y T20.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención se refiere a una composición para el uso en la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones virales, en la que la composición comprende un extracto acuoso de al menos una de las partes aéreas de plantas del género *Ribes*, en la que las partes aéreas se seleccionan del grupo que consiste en hojas y ramas.

En una realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, la infección viral comprende una enfermedad de resfriado común.

15 Más preferiblemente, la enfermedad de resfriado común comprende una infección primaria, provocada por rinovirus, adenovirus o coronavirus.

En una realización preferida adicional, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, la composición se usa para el tratamiento de resfriados de cabeza.

En otra realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, la infección viral comprende influenza. Más preferiblemente, la influenza es gripe aviar.

20 En una realización preferida adicional, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, la infección viral está provocada por retrovirus, más preferiblemente por lentivirus. En particular, la infección viral está provocada por VIH-1 y/o VIH-2.

En una realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, la planta es *Ribes nigrum* L.

25 En otra realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, la planta es *Ribes rubrum* L.

En una realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, la composición además comprende un extracto de los frutos de las plantas del género *Ribes*.

30 En una realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, la composición está en forma líquida, seca o semisólida.

En una realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, la composición se administra por vía oral, por vía intranasal o de manera tópica.

En una realización preferida alternativa, la composición está presente como un agente nasal, mezcla de inhalación, aerosol o ambientador de spray.

35 La composición también puede estar presente preferiblemente en forma de un comprimido, comprimido recubierto, comprimido efervescente, cápsula, polvo, granulado, comprimido recubierto de azúcar, pomada, gel, crema, disolución para hacer gárgaras o zumo vegetal.

40 La presente invención se refiere al uso de un extracto acuoso de al menos una de las partes aéreas de plantas del género *Ribes*, en la que las partes aéreas se seleccionan del grupo que consiste en hojas y ramas para la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones virales.

En la presente invención, el término "partes aéreas de una planta" se refiere a hojas y ramas.

En la presente invención, el término "rama" se refiere a un pequeño brote o ramificación que tiene un diámetro de 3 cm como máximo. Preferiblemente, el diámetro de las ramas es de hasta 1 cm.

45 Según la invención, el término "extracto acuoso" se usa de manera representativa para todos los productos que se obtienen a partir de un sujeto herbáceo por medio de una extracción con agua, tal como con maceración o percolación.

En la presente invención, el término "profilaxis" se refiere a un procedimiento para prevenir una enfermedad. Las medidas profilácticas pueden dividirse en profilaxis primaria (prevención del desarrollo de una enfermedad) y

profilaxis secundaria (protección frente al empeoramiento cuando ya se ha desarrollado una enfermedad).

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

- 5 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 gripe aviar provocada por los subtipos H5 y H7.

Se entienden como enfermedades de resfriado común para los fines de la invención inflamaciones de las vías respiratorias, que significan, como norma, la nariz, faringe, laringe, tráquea y bronquios. Los términos "enfermedades de resfriado común" y "resfriados virales" se usan de forma sinónima en este caso. Un resfriado viral se distingue de influenza en que esta última está provocada sólo por el virus influenza.

Un resfriado viral, por otra parte, habitualmente se produce por adenovirus, coronavirus y/o rinovirus.

Los adenovirus (*Adenoviridae*) pertenecen a la familia de virus de ADN cúpicos sin envuelta y tienen un diámetro de 60 a 90 nm. El genoma consiste en un ADN bicatenario lineal de aproximadamente 36 kb de largo. Se diferencian aproximadamente 50 tipos inmunológicamente distintos de adenovirus, con aproximadamente 35 tipos patógenos humanos en los subgéneros A - F. La familia *Adenoviridae* se divide en los géneros *Mastadenovirus*, que pueden infectar mamíferos, y *Aviadenovirus*, que son endémicos en diversas especies de aves. Los adenovirus se caracterizan por la estabilidad poco habitual ante efectos químicos y físicos y toleran los niveles de pH más adversos, lo que les permite un tiempo de supervivencia comparativamente largo fuera del cuerpo del huésped.

Los adenovirus provocan principalmente dolencias de las vías respiratorias. Dependiendo del serotipo particular, sin embargo, también pueden provocarse varias de otras dolencias, por ejemplo, gastroenteritis, conjuntivitis, cistitis, faringitis o diarreas. Los síntomas de la dolencia de las vías respiratorias provocada por adenovirus oscilan entre el resfriado común y la bronquitis y la neumonía. En el caso de pacientes con sistemas inmunitarios debilitados, existe una propensión especial a complicaciones graves debidas a las infecciones por adenovirus, tales como SDRA (síndrome de dificultad respiratoria aguda), por ejemplo. Además, se sospecha que existe una correlación entre el tipo viral Ad-36 y la obesidad en los seres humanos.

Los coronavirus, que pertenecen al género *Coronaviridae*, provocan generalmente dolencias leves de las vías respiratorias altas en los seres humanos, rara vez gastroenteritis y el síndrome respiratorio agudo grave (SRAG), provocado por el coronavirus asociado a SRAG, SARS-CoV.

Los coronavirus se clasifican en la familia de los virus de ARN pleomórficos con envuelta y tienen un diámetro de 70 a 160 nm. Tienen un ARN monocatenario de sentido positivo con una longitud de desde 20 hasta 30 kb. El género *Coronaviridae* se divide en tres géneros: los coronavirus, los arterivirus y los torovirus. De éstos, sólo los coronavirus comprenden virus patógenos humanos. La transmisión de los virus tiene lugar a través de infección por gotas (aerogénica), como infección de suciedad o frotis (fecal-oral) o incluso a través de un simple contacto (mecánico) con una persona infectada. Los organismos infectados más jóvenes, en este caso, pueden enfermar de forma más grave que los más mayores. Los coronavirus provocan entre el 15 y el 30% de las enfermedades de resfriado común en los seres humanos con fiebre ligera, resfriado de cabeza, tos y dolor de garganta.

Una irritación aguda o crónica de la mucosa nasal con los síntomas de picor, estornudos, secreción y congestión provocados por mecanismos infecciosos, alérgicos y no alérgicos se denomina rinitis, catarro nasal, coriza o coloquialmente, resfriado de cabeza. El patógeno es habitualmente un género del picornavirus, el rinovirus. La infección con rinovirus tiene lugar a través de transmisión directa, por ejemplo, a través de manos contaminadas o también mediante infección por gotas.

Hasta ahora, se han identificado más de 115 serotipos de este género. Los rinovirus tienen un ARN monocatenario de sentido positivo (ARN mensajero) con una longitud de desde 7,2 hasta 8,5 kb. Éstos son virus desnudos con una estructura icosaédrica y un diámetro de desde 24 hasta 30 nm. La envuelta proteica (cápside) de 10 a 15 nm de grosor que rodea el ARN consiste en 60 subunidades dispuestas simétricamente, que se denominan protómeros. Cada protómero consiste en las cuatro proteínas de la cápside VP1, VP2, VP3 y VP4. El número múltiple de protómeros se considera la causa de la versatilidad antigénica de los rinovirus.

Tal como ya se mencionó anteriormente, las enfermedades de resfriado común están provocadas habitualmente por adenovirus, coronavirus y/o rinovirus. Dependiendo del tipo de virus de la infección, pueden producirse quejas por el resfriado tales como resfriado de cabeza, tos, ronquera, dolor de garganta, por ejemplo, provocado por inflamación de las amígdalas y la faringe, dolor articular y dolor de cabeza, fiebre ligera y agotamiento. Para los fines de la invención, también se cuentan la bronquitis y la neumonía bronquial como enfermedades de resfriado común.

De estas enfermedades de resfriado común, lo que se produce más frecuentemente en los meses de invierno es un resfriado de cabeza. Está provocado por una infección con rinovirus, o, menos frecuentemente, con adenovirus. La composición o preparación descrita se usa preferiblemente para la profilaxis y/o el tratamiento de resfriados de cabeza, en particular en la profilaxis y/o el tratamiento de resfriados de cabeza provocados por rinovirus.

Además, pueden producirse infecciones bacterianas, que “se establecen” en la infección viral ya existente, con enfermedades de resfriado común. Las infecciones de esta clase se denominan infecciones bacterianas secundarias o superinfecciones bacterianas. La composición para su uso según la invención también puede usarse para la profilaxis y/o el tratamiento de estas infecciones bacterianas secundarias.

5 Los viriones de retrovirus consisten en partículas con envuelta que tienen un diámetro de partícula de aproximadamente 100 nm y también contienen dos moléculas de ARN monocatenario idénticas de 7 a 10 kb de longitud. Los principales componentes de los retrovirus son

- una envuelta que se compone de una bicapa lipídica obtenida a partir de la membrana plasmática del huésped,

- ARN dímero que tiene una caperuza en el extremo 5' y poliadenilo en el extremo 3', y

10 - proteínas que contienen proteínas gag como principales componentes de la cápside viral, proteasa que funciona en escisiones proteolíticas durante la maduración del virión, proteínas pol responsables de la síntesis de ADN viral y la integración en ADN del huésped tras la infección y proteínas env que desempeñan un papel en la asociación y la entrada del virión en la célula huésped.

15 El VIH es un virus que pertenece a la familia de *Retroviridae* y el género de lentivirus. Es aproximadamente esférico, teniendo un diámetro de aproximadamente 120 nm y se compone de dos copias de ARN monocatenario positivo, que se une a proteínas de la nucleocápside y enzimas requeridas para el desarrollo del virión (por ejemplo, transcriptasa inversa, proteasas, ribonucleasa e integrasa). La cápside está rodeada por una matriz que se compone de proteína viral, que además está rodeada por la envuelta viral que se compone de dos capas de fosfolípidos de la membrana de una célula humana. En dicha envuelta, están incluidas proteínas adicionales de la célula huésped y copias de una proteína de VIH compleja. La proteína consiste en una caperuza compuesta por tres moléculas de glicoproteína y un tallo que ancla la estructura en la envuelta viral. La glicoproteína permite que el virus se una y se fusione con células diana para iniciar el ciclo infeccioso.

20 El VIH infecta células en el sistema inmunitario y el sistema nervioso central. En particular, el VIH entra en macrófagos y células T cooperadoras, en particular células T CD4+, mediante adsorción de la glicoproteína a receptores en la célula diana, fusión de la envuelta viral con la membrana celular y liberación de la cápside del VIH en la célula. Tras la penetración en la célula, el VIH produce nuevas copias de sí mismo que continúan infectando otras células. Por tanto, la infección por VIH conduce finalmente a una reducción en el número de células T cooperadoras a través de tres mecanismos principales mediante la destrucción viral directa de células infectadas, aumento de la tasa de apoptosis en células infectadas y destrucción de células T CD4+ infectadas por linfocitos citotóxicos CD8 que reconocen las células infectadas. Si el nivel de células T CD4+ disminuye por debajo de un nivel crítico, se pierde la inmunidad mediada por células y el cuerpo se vuelve más propenso a infecciones oportunistas.

25 El VIH puede dividirse además en VIH-1 y VIH-2. Para el VIH-1, existen los subtipos A a J, los subtipos más comunes son 1A, 1B, 1C y 1D. El VIH-2 puede dividirse en los subtipos A a E. Es menos patógeno que VIH-1.

30 Además del VIH, otro retrovirus humano es el virus linfotrófico humano de células T, en particular el virus linfotrófico humano de células T tipo 1 (HTLV-1). HTLV-1 es un retrovirus de ARN humano que provoca leucemia de células T y linfoma de células T y también puede estar implicado en enfermedades desmielinizantes, tales como la paraparesia espástica tropical.

35 Retrovirus adicionales incluyen el virus de la leucosis aviar, el virus del sarcoma de Rous, el virus de tumor mamario de ratón, el virus de la leucemia murina, el virus de la leucemia felina, el virus de la leucemia bovina, el virus del sarcoma dérmico de Walley, el virus de la inmunodeficiencia del simio y felina, el virus de la anemia infecciosa equina y el virus espumoso del simio que provocan enfermedades tales como leucemia o sarcomas de felinos, leucemia o sarcomas de la gallina, leucemia o sarcomas del ratón, anemia infecciosa equina, leucemia bovina y artritis-encefalitis caprina.

40 Según la invención, la planta *Ribes* se usa para producir una composición para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones virales.

Ribes es un género que cubre aproximadamente 150 especies de plantas con flor, que son nativas en la totalidad de las regiones templadas del hemisferio norte, y en las cordilleras de América Central y Sudamérica. El género de *Ribes* incluye las grosellas.

Son de interés particular en la presente invención:

50 *Ribes nigrum* L (*R. nigrum* L)

Ribes rubrum L. (*R. rubrum* L)

R. nigrum L. y *R. rubrum* L. contienen flavonoides, terpenoides y aceites esenciales en diferentes concentraciones. Por ejemplo, la concentración puede diferir con respecto a las hojas y los frutos de la planta *Ribes*. Por tanto, a continuación, se consideran las hojas y los frutos por separado.

El término científico "*Ribes nigri folium* (*R. nigri folium*)" se refiere a las hojas de *R. nigrum* L. mientras que el término "*Ribes nigri fructus* (*R. nigri fructus*)" se refiere a los frutos de *R. nigrum* L. Por consiguiente, *Ribes rubri folium* (*R. rubri folium*) se refiere a las hojas de *R. rubrum* L. y *Ribes rubri fructus* (*R. rubri fructus*) a los frutos de *R. rubrum* L.

5 Los flavonoides consisten básicamente en dos anillos aromáticos y uno heterocíclico oxigenado. Usando las diferencias estructurales en el anillo O-heterocíclico, los flavonoides pueden dividirse en los siguientes seis grupos: flavonoles, flavanoles, flavanones, flavonas, antocianinas e isoflavanoides. Algunos de los componentes detectados en *R. nigrum* L son flavonoles, tales como quercetina y miricetina y sus glicósidos, así como dímeros y oligómeros de proantocianidinas.

10 *R. nigri folium* comprende trazas de aceites esenciales, glicósido de flavonol y proantocianidina. *R. nigri fructus* contiene antocianidinas y glicósidos de flavonol, en particular isoquercitrina, D-glucopiranosido de miricetina y rutosina. Componentes adicionales de *R. nigri fructus* son ácidos frutales, tales como ácido cítrico, ácido isocítrico y ácido málico, derivados de ácido hidroxicinámico, vitamina C y en las semillas ácido γ -linólico.

15 *R. rubri folium* contiene glicósidos de flavonol, tales como astragalina e isoquercetina, porcianidinas y derivados de catequina. *R. rubri fructus* contiene vitamina C, ácidos frutales, pectinas, procianidinas y taninos. Las semillas comprenden ácido γ -linólico [Hager's Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Drogen P-Z, 5., vollständig neubearbeitete Auflage, Springer-Verlag, 1993, páginas 466-474].

20 La composición usada según la invención se produce a partir de al menos una de las partes aéreas de las plantas seleccionadas del grupo de hojas y ramas. Preferiblemente, se usan los brotes aéreos de la planta que vuelven a crecer en el mismo año. En general, pueden usarse todos los elementos de la parte aérea de la planta, tales como hojas, ramas, flores, frutos y semillas. Preferiblemente, se usan las ramas con hojas y flores.

En otra realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, se añade un extracto de los frutos a la composición producida a partir de las hojas y ramas.

25 Las partes de la planta, incluyendo hojas, ramas y frutos pueden o bien secarse o bien prensarse directamente tras la cosecha, lo que significa en el estado en bruto, tras romperse, cuando sea apropiado, para producir un zumo a partir del prensado.

30 En una realización adicional, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, se someten las partes de plantas en el estado en bruto a una extracción con agua, tal como una maceración o percolación, por ejemplo. Alternativamente, las partes de plantas también pueden secarse y/o posteriormente romperse en pequeños trozos de manera adecuada antes de la extracción, por medio de frote o corte de las mismas, por ejemplo.

35 En una realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, se usan *R. nigri folium* y/o *R. rubri folium* para la preparación del extracto acuoso de la presente invención. En otra realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, se usan *R. nigri folium* y *R. nigri fructus* para la preparación del extracto acuoso. En una realización preferida adicional, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, se usan *R. rubri folium* y *R. rubri fructus*. En otra realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, se usan *R. nigri folium* y *R. rubri fructus* para la preparación del extracto acuoso. En otra realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, se usan *R. rubri folium* y *R. nigri fructus* para la preparación del extracto acuoso.

40 En la presente invención, la composición comprende un extracto acuoso de la planta *Ribes*. Generalmente, tiene lugar una extracción de las partes de plantas incluyendo hojas, ramas y frutos con agua.

45 Normalmente se lleva a cabo la extracción a temperaturas de 25°C a, cuando sea aplicable, tan altas como del punto de ebullición del agua. Se prefiere una extracción a de 95 a 100°C. Normalmente se lleva a cabo la extracción durante de 2 a 8 h. Preferiblemente, se lleva a cabo la extracción durante de 3 a 6 h, más preferiblemente durante de 4 a 5 h.

Para lograr el mayor rendimiento posible, el material de planta puede extraerse varias veces. Preferiblemente, la extracción se repite de 2 a 6 veces, más preferiblemente 3 veces.

50 Como resultado de la extracción acuosa, se obtiene un producto sin tratar, que puede usarse en esta forma soluble para producir una composición para la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones virales.

Normalmente se realiza un procedimiento de maceración durante de cinco a nueve días, preferiblemente durante siete días, a temperatura ambiente con una mezcla de agua y etanol, vertiendo la mezcla de disolventes sobre los elementos de planta y dejándolo en reposo durante el periodo de tiempo mencionado.

Según la invención, normalmente se logra una percolación de las partes de plantas mediante el tratamiento de las

partes con agua a de 95 a 100°C durante de cuatro a cinco horas conduciendo el agua a través de las partes de plantas.

5 El producto en bruto obtenido a partir de una extracción con agua, tal como una maceración o percolación, también puede concentrarse y/o secarse y/o procesarse adicionalmente antes de su uso. El procesamiento adicional puede incluir, por ejemplo, etapas de limpieza conocidas por el experto en la técnica, tales como centrifugación, filtración y decantación, para retirar los materiales en suspensión del extracto. También puede usarse cromatografía, tal como cromatografía en columna, cromatografía de gases o HPLC o destilación con vapor para purificación. En una realización preferida, se usa el producto en bruto sin etapas de purificación adicionales.

10 Un extracto acuoso obtenido de esta manera puede posteriormente procesarse adicionalmente para dar un extracto seco. Para producir el extracto seco, puede eliminarse el disolvente del extracto líquido sin tratar, el extracto concentrado o el extracto limpiado mediante, por ejemplo, secado por pulverización, liofilización o secado a vacío.

La composición de la planta *Ribes* puede usarse para la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones virales en cada una de las formas descritas anteriormente.

15 La composición se usa preferiblemente para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades de resfriado común que están provocadas por rinovirus, adenovirus o coronavirus.

En una realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, se usa un extracto acuoso de *R. nigrum* L para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades de resfriado provocadas por rinovirus. En particular, dicho extracto es un extracto de *R. nigri folium*.

20 En otra realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, se usa un extracto acuoso de *R. nigrum* L. para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades de resfriado provocadas por adenovirus. En particular, dicho extracto es un extracto de *R. nigri folium*.

25 En una realización preferida adicional, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, se usa un extracto acuoso de *R. nigrum* L para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades de resfriado provocadas por coronavirus. Más preferiblemente, dicho extracto es un extracto de *R. nigri folium*.

El extracto descrito se usa además para la profilaxis y/o el tratamiento de influenza A y B. En una realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, el extracto es 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 gripe aviar provocada por el subtipo H7.

30 Preferiblemente, se usa un extracto de *R. nigrum* L. para la profilaxis y/o el tratamiento de influenza A y B, más preferiblemente se usa un extracto acuoso de *R. nigri folium*.

35 En otra realización preferida, la composición de la planta *Ribes* puede usarse para la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones virales provocadas por retrovirus en cada una de las formas descritas anteriormente. La composición se usa preferiblemente para la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones virales que están provocadas por lentivirus, en particular VIH-1 y/o VIH-2.

En una realización preferida adicional, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, se usa un extracto de *R. nigrum* L. para la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones virales provocadas por retrovirus. En particular, dicho extracto es un extracto de *R. nigri folium*. En particular, el extracto puede usarse para la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones virales provocadas por VIH-1 y/o VIH-2.

40 La composición puede administrarse por tanto como medicamento. Además del uso terapéutico, la composición también es adecuada para la profilaxis no terapéutica y/o el tratamiento de enfermedades de resfriado común.

45 La composición puede aplicarse en cada una de las formas de aplicación con las que está familiarizado el experto en la técnica para uso tanto médico como no médico, por ejemplo, como comprimidos, comprimidos recubiertos, comprimidos efervescentes, cápsulas, polvos, granulados, comprimidos recubiertos de azúcar, pomadas, cremas, geles, disoluciones o espráis. Preferiblemente, la composición se aplica como spray nasal.

50 En formas de aplicación galénicas y otras, la composición puede procesarse con los adyuvantes galénicos habituales, tales como aglutinantes de comprimidos, agentes de carga, agentes conservantes, agentes de apertura de comprimidos, agentes de regulación del flujo, emoliente, agentes humectantes, agentes dispersantes, agentes emulsionantes, disolventes, agentes retardantes, agentes antioxidativos, reguladores de la consistencia, agentes de mejora de la penetración y/o gases propelentes.

Pueden añadirse elementos adicionales, tales como vitaminas y minerales, a la composición.

La composición también puede añadirse, por ejemplo, a un pienso animal o productos alimenticios, tales como bebidas. En forma de un extracto, la propia composición también puede infundirse como té. También es posible, sin

embargo, verter agua caliente directamente sobre las partes de plantas, por ejemplo, las hojas de las plantas *Ribes*, para la preparación de té. Además, la composición puede ser un constituyente de complementos alimenticios, cuya ingestión en los meses de invierno puede contribuir a fortalecer las defensas del organismo y, por consiguiente, prevenir una infección viral.

- 5 En una realización adicional, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, la composición puede usarse según la invención como una disolución, en particular, una disolución para hacer gárgaras, para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades de resfriado común, en particular de inflamaciones en la boca y la faringe.

- 10 La composición también puede usarse mezclada con constituyentes de otras plantas, en cuyo caso los constituyentes están preferiblemente en forma de extractos de plantas. Preferiblemente, se usan constituyentes de plantas o extractos de plantas con un efecto similar o sinérgico. Ejemplos son plantas del género *Cistus*, en particular *Cistus incanus*.

- 15 La concentración de la composición en la forma de aplicación varía, dependiendo del tipo de aplicación. Como norma, la cantidad de la composición asciende a entre 0,5 y 1.000 mg por unidad de dosificación para formas de aplicación sólidas. Preferiblemente, la cantidad de la composición asciende a entre 1 y 500 mg por unidad. En formas de aplicación líquidas, la composición puede estar en una concentración de 1 µg/ml a 100 mg/ml, preferiblemente de desde 25 µg/ml hasta 50 mg/ml. En el caso de formas de aplicación semisólidas, el contenido de la composición asciende a del 1 al 90% en peso, preferiblemente del 5 al 75 % en peso.

- 20 En una realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, se administra la composición en forma de un comprimido. Se prefiere que la composición esté en forma de un extracto en este caso. Lo más preferido especialmente, la composición está en forma de un extracto seco.

- 25 En una realización preferida adicional, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, se administra la composición en forma de emulsiones, pomadas, geles o cremas para aplicación tópica. En este caso, la composición se usa preferiblemente en forma de un extracto en el que se retiran las sustancias activas de la planta por medio de extracción con una grasa, una cera o un aceite. Se prefiere además que este extracto se procese adicionalmente para dar un extracto seco, que se mezcla posteriormente con o se disuelve en una grasa, una cera o un aceite.

- 30 En una realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, la composición está en forma de un aerosol o ambientador de spray. Preferiblemente, se usa un extracto líquido o sólido de *Ribes* para esto. Además del extracto, el aerosol o ambientador de spray también puede contener sustancias farmacéuticamente inocuas, medios portadores y agentes auxiliares. El aerosol o ambientador de spray puede usarse para desinfectar objetos y ambientes con los que los virus entran en contacto o podrían entrar en contacto potencialmente, particularmente medios de transporte de todos los tipos en los que se transportan personas, animales y/o productos alimenticios. Por ejemplo, puede pulverizarse un avión con el aerosol según la invención o con el ambientador de spray según la invención antes de despegar, para impedir la propagación de los virus y, por consiguiente, para minimizar el riesgo de infección para las personas. También puede pulverizarse el aerosol o ambientador de spray en presencia de personas, por ejemplo, en salas de espera, porque no provoca ningún efecto tóxico en absoluto en las personas.

- 40 En una realización preferida adicional, en combinación con una cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente o a continuación, la composición también puede administrarse como agente nasal o como disolución para inhalación. El agente nasal puede usarse como spray nasal o como gel nasal. Para la administración, pueden usarse diversos aplicadores y sistemas de dispersión.

- 45 El uso de *Ribes* según la invención no se restringe a personas, sino que en su lugar también es posible para animales, particularmente mamíferos, tales como mascotas o ganado.

Los siguientes ejemplos explican la invención.

Se sometió a prueba un extracto de *Ribes* con respecto a su toxicidad celular y viabilidad celular, así como su actividad antiviral frente a rinovirus, actividad antiviral frente a influenza A y B y actividad antiviral frente a VIH.

- 50 El rinovirus humano tipo 14 sirvió como aislado viral en el caso de someter a prueba la actividad antiviral frente a rinovirus.

El virus de influenza A, A/Bratislava/79 (H7N7) (FPV) (aviar), el virus de influenza A, A/Mallard/Bavarian/1/2006 (H5N1) (aviar) así como el virus de influenza A, A/Puerto-Rico/8/34 (H1N1) (PR8) (humano) sirvieron como aislados virales en el caso de someter a prueba la actividad antiviral frente a gripe. Células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y células A549 sirvieron como líneas celulares del huésped.

- 55 Para determine las características del extracto, se usaron los siguientes métodos de examen.

Además, se determinó la concentración tóxica del extracto.

Se trataron células epiteliales de riñón canino MDCK II durante 30 minutos con diferentes concentraciones del extracto (de 95 a 950 µg/ml). Posteriormente, se trataron las células durante 48 horas con las mismas concentraciones del extracto.

5 Examen del efecto citopatológico (ECP)

En una primera prueba, se infectaron células epiteliales de riñón de perro MDCK II con las cepas del virus influenza virus de influenza A, A/Mallard/Bavarian/1/2006 (H5N1) y A/FPV/Bratislava/79 (H7N7). Se trataron posteriormente las células infectadas con diferentes concentraciones del extracto (95, 190, 285, 380, 475, 570, 665, 760, 855 y 950 µg/ml).

10 En una segunda prueba, se pretrataron las células durante 30 minutos con diferentes concentraciones del extracto (de 95 a 950 µg/ml) y se infectaron posteriormente con las cepas del virus influenza virus de influenza A, A/Mallard/Bavarian/1/2006 (H5N1) y A/FPV/Bratislava/79 (H7N7). Se trataron posteriormente las células infectadas con diferentes concentraciones del extracto (95, 190, 285, 380, 475, 570, 665, 760, 855 y 950 µg/ml).

15 En una tercera prueba, se pretrató la disolución de infección que contenía virus con diferentes concentraciones del extracto (de 95 a 950 µg/ml) durante 30 minutos. Se pretrataron las células durante 30 minutos con diferentes concentraciones del extracto (de 95 a 950 µg/ml) y se infectaron posteriormente con las cepas del virus influenza pretratadas virus de influenza A, A/Mallard/Bavarian/1/2006 (H5N1) y A/FPV/Bratislava/79 (H7N7). Se trataron posteriormente las células infectadas con diferentes concentraciones del extracto acuoso (95, 190, 285, 380, 475, 570, 665, 760, 855 y 950 µg/ml).

20 Se determinó la concentración eficaz (CE50) para la inhibición del 50% del ECP.

Ejemplo

Preparación de un extracto de *Ribes nigrum* L.

25 Se usan las ramas y las hojas para extracción. Se seca el material vegetal a temperatura ambiente en exterior a la sombra, hasta un contenido en agua residual de un máximo del 10%. Posteriormente, se cortan las partes hasta un tamaño de ≤ 8 mm.

Se someten las partes de plantas cortadas a percolación a de 95 a 100°C con diez veces la cantidad de agua purificada según la Farm. Eur. durante de 4 a 5 horas. Se concentra la disolución producida hasta del 18 al 19% del volumen original por medio de un evaporador de placas a una temperatura de vapor de 75 a 80°C. El contenido de la sustancia seca asciende a aproximadamente el 45%.

30 Usando un evaporador con agitador, se aumenta el contenido de la sustancia seca hasta del 50 al 51% por medio de calentamiento del extracto durante cuatro horas a de 110 a 114°C a presión reducida (0,6 bares).

35 Finalmente, se lleva a cabo secado con banda de vacío a 16 mbar con gradientes de temperatura descendientes (140°C, 120°C, 90°C, 20°C). El contenido de la sustancia seca asciende a >92% con un rendimiento global del extracto seco del 22 al 25%. Posteriormente se tritura el extracto. Entonces se produce a partir de este extracto la disolución madre descrita en lo anterior.

La concentración a la que el 50% de las células MDCK II estaban muertas (CT50) era de 8512 ± 11,40 µg/ml.

Por tanto, se concluye que el extracto no es tóxico.

Exámenes de la actividad antiviral

Virus influenza humanos

40 Para las investigaciones de la actividad antiviral, se pretrataron células epiteliales de pulmón A549 durante 30 minutos con 50 µg/ml del extracto y se infectaron posteriormente con la cepa del virus influenza A/PR8/34 (H1N1), que también se ha pretratado durante 30 minutos con 50 µg/ml del extracto. Tras la infección, se trataron las células de nuevo durante 30 minutos con 50 µg/ml del extracto. Se aislaron los sobrenadantes del medio y se investigaron en ensayos de placas de lisis para virus influenza recién formados.

45 Se muestra el resultado en la figura 1.

Tal como puede tomarse a partir de la figura 1, se observó una reducción del título viral de más de un orden de magnitud.

Se observa un fuerte efecto inhibitor sobre la propagación viral de diferentes virus influenza en las líneas celulares del huésped.

Examen del efecto citopatológico (ECP) inducido por virus de la gripe aviar

La primera prueba (postratamiento de las células) mostró un valor de CE50 del extracto de $390,93 \pm 85,5$ µg/ml para virus de influenza A, A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) y de $165,3 \pm 8,55$ µg/ml para virus de influenza A, A/Mallard/Bavarian/1/2006 (H5N1).

- 5 La segunda prueba (pre y postratamiento de las células) mostró un valor de CE50 del extracto de $278,35 \pm 48,45$ µg/ml para virus de influenza A, A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) y de $83,6 \pm 2,85$ µg/ml para virus de influenza A, A/Mallard/Bavarian/1/2006 (H5N1).

- 10 La tercera prueba (pre y postratamiento de las células y adicionalmente pretratamiento de la disolución viral) mostró un valor de CE50 del extracto de $46,55 \pm 6,65$ µg/ml para virus de influenza A, A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) y de $13,3 \pm 1,9$ µg/ml para virus de influenza A, A/Mallard/Bavarian/1/2006 (H5N1).

Además, no se observó inhibición de neuramidasa viral de influenza A.

En el resultado, pudo verse que el extracto de *Ribes* podía inhibir la infección provocada por virus de la gripe aviar altamente patógenos. En la concentración usada, el extracto no tuvo influencias dañinas detectables sobre las células en absoluto. Esto prueba un efecto inhibitorio de los extractos de *Ribes* sobre la infectividad de influenza.

15 Cultivo de rinovirus

- 20 Se inocularon cuatro matraces T175 con células HeLa confluentes al 80% con rinovirus humano (RVH) tipo 14 y se incubaron a 33°C durante una semana. Para ello, se mezclaron 50 µl de RVH14 (título viral de 10^8 /ml de DICT (dosis infecciosa de cultivo tisular)) en 16 ml de medio de infección (DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), FCS al 2% (suero de ternero fetal), $MgCl_2$ 10-20 mM) y se añaden 4 ml a cada matraz T175. Entonces se llena cada matraz T175 con 10 ml de medio de infección, de modo que haya 14 ml de medio de infección en cada matraz T175. Tan pronto como se disuelve el 70% de las células adherentes, se recoge el virus.

Purificación de los rinovirus

- 25 En primer lugar se centrifuga el sobrenadante viral durante 30 minutos a 3.000 rpm para retirar el sedimento celular. En la ultracentrifuga, se centrifuga el sobrenadante viral a 35.000 rpm (rotor tipo SW41 Ti en tubos de polialómero de Beckman) a 4°C durante tres horas en colchones de sacarosa (1,5 ml de sacarosa al 65% en agua, 300 µl de PBS (solución salina tamponada con fosfato) 10X, 1,2 ml de agua) y se incorpora el sedimento a 100 µl de medio de infección. Además, tiene lugar la concentración viral con un filtro con punto de corte de 100 kDa (Centricon YM100) a 3.300 rpm durante una hora a 4°C. El material retenido contiene el concentrado viral purificado; se desecha el filtrado.

- 30 Para someter a prueba el efecto del extracto de *Ribes* sobre la infectividad de RVH14, se añadió el extracto de *Ribes* al medio de infección o se pretrataron adicionalmente los virus con el extracto de *Ribes*.

- 35 En el resultado, pudo verse que el extracto de *Ribes* pudo prevenir la infección y, por tanto, la destrucción de la capa celular tanto en el medio de infección como tras la preincubación adicional de los virus en todos los lotes realizados. El extracto de *Ribes* no tuvo influencias dañinas detectables sobre las células en absoluto. Esto prueba un efecto inhibitorio de los extractos de *Ribes* sobre la infectividad de rinovirus.

Pruebas *in vitro* de sustancias de actividad antiviral en el ensayo de HeLa-P4Principio del ensayo

- 40 Las células HeLa-P4 (del Programa de Investigación y Referencia sobre el SIDA del NIH) son una línea celular, que se transfectó con genes para el receptor CCR5 y CD4- humano y que por tanto pueden infectarse con VIH-1 (se expresa el receptor CXCR4 en las células). Para la cuantificación de la infección por VIH, las células portan un gen indicador, es decir el gen de la β-galactosidasa, que está bajo el control del promotor del VIH-1. Tras la infección, la proteína Tat del VIH-1 transactiva el gen indicador y puede cuantificarse el grado de infección mediante la medición de la actividad enzimática en el lisado de las células. Una inhibición de la infección por VIH da como resultado una menor actividad β-galactosidasa con respecto a la infección con virus sin la adición de sustancias. El fondo se define midiendo la actividad enzimática en células, a las que no se añadió virus. Puesto que en principio una menor infección también puede basarse en los efectos tóxicos de las sustancias en las células, además de dicho ensayo también se lleva a cabo un ensayo de citotoxicidad.

Parte experimental

- 50 Se preparan las sustancias de prueba añadiendo 1 mg de cada muestra en un vial Eppendorf y disolviendo la muestra en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 60°C con agitación en vórtex. Se filtra la disolución en condiciones estériles y se pone en un nuevo vial Eppendorf. Como control positivo, se usa el péptido T20 (un inhibidor de la entrada de VIH-1 conocido; enfuvirtida). Se preparan series de dilución del compuesto de

prueba así como de T20 en medio de cultivo celular, en el que las muestras tienen concentraciones de 78, 15,6, 7,8, 3,9, 0,8, 0,4 µg/ml, y se usa el control positivo T20 en concentraciones de 39, 19,5, 3,9, 1,95, 0,78, 0,39, 0,039 nM. Se sometió a prueba cada una de las concentraciones de sustancia por triplicado.

5 DÍA 1: siembra en placa de $1,5 \times 10^4$ células HeLa-P4 en 100 µl de medio (DMEM, FCS al 10%, L-glutamina al 2%, penicilina al 1%/estreptomocina, gentamicina 500 µg/ml, puromicina 1 µg/ml) por cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos, incubación mediante 37°C durante la noche.

10 DÍA 2: en un laboratorio L3, se preincuban 78 µl de cada una de las diluciones de sustancia (78, 15,6, 7,8, 3,9, 0,8, 0,4 µg/ml) con 22 µl del virus VIH-1 Lai a 37°C durante 30 minutos, se tratan las diluciones de T20 (39, 19,5, 3,9, 1,95, 0,78, 0,39, 0,039 nM) de la misma manera. Se elimina el medio de las células HeLa-P4, se lavan las células con 100 µl de PBS y se añaden las mezclas de sustancia-virus a las células. Se incuban las células durante 2 h a 37 °C, después se retira el sobrenadante, se lava con PBS y se añaden 100 µl de medio nuevo, y se incuban las células durante 2 días a 37°C.

15 DÍA 4: se retira el sobrenadante, se lavan las células con 100 µl de PBS y se lisan en 50 µl de tampón de lisis por cada pocillo (2,5 ml de glicerol; 1,25 ml de MES-Tris, 25 µl de DTT 1 M, 250 µl de Triton X100, H₂O hasta 25 ml) durante 10 minutos sobre hielo y se retiran a -80°C. Se pulverizan las placas por el exterior con biguanida para transferirlas fuera del laboratorio L3. En una placa de microtitulación blanca, se ponen 34 µl de tampón de reacción (15 µl de MgCl₂ 1 M, 3 ml de NaH₂PO₄ 0,5 M/Na₂HPO₄, 150 µl de Galacton 100x, hasta 15 ml de H₂O) en cada pocillo y se añaden 20 µl de lisado celular. Se agita la placa de microtitulación durante de 45 a 60 minutos en la oscuridad y posteriormente tras la adición de 25 µl de amplificador (80 µl de NaOH 10 M, 400 µl de Emerald 10x (Applied Biosystems), hasta 4 ml de H₂O) por cada pocillo, se mide la actividad enzimática en un luminómetro (Lumistar Galaxy, BMG Labtechnologies, Offenburg; ajustes: microplaca: Dynatech 96, número de intervalos: 50, tiempo del intervalo de medición: 0,2 segundos, retardo de colocación: 0,5 segundos, tiempo de medición total/pocillo: 10 segundos, ganancia: 250, intervalo de inicio: 1, intervalo de detención: 50).

Prueba de citotoxicidad

25 Principio del ensayo

El ensayo de citotoxicidad analiza sustancias en vista de los efectos tóxicos a las células.

30 Se usaron células HeLa-P4 para el ensayo de citotoxicidad. Se usó un kit disponible comercialmente (kit ViaLight® Plus, Lonza, Rockland, EE.UU.). El principio del kit se basa en mediciones de la cantidad de ATP en el citoplasma de células activas metabólicas, es decir vivas. Cualquier alteración en la viabilidad de las células da como resultado una reducción de la cantidad de ATP. Se determina la cantidad de ATP mediante mediciones bioluminométricas, en las que se forma luz por la enzima luciferasa a partir de ATP y el sustrato luciferina en presencia de oxígeno. La intensidad de la luz emitida es proporcional a la concentración de ATP y se determina en un luminómetro (Lumistar Galaxy, BMG Labtechnologies, Offenburg).

Parte experimental

35 Se preparan las sustancias de prueba tal como se describió anteriormente en vista de las pruebas *in vitro* de actividad antiviral en el ensayo de HeLa-P4. Se sometió a prueba cada una de las concentraciones de sustancia por cuadruplicado.

40 DÍA 1: siembra en placa de $1,5 \times 10^4$ células HeLa-P4 en 100 µl de medio (DMEM, FCS al 10%, L-glutamina al 2%, penicilina al 1%/estreptomocina, gentamicina 500 µg/ml, puromicina 1 µg/ml) por cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos, incubación mediante 37°C durante la noche.

DÍA 2: se elimina el medio y se lavan las células con 100 µl de PBS. Se ponen 78 µl de cada una de las diluciones de sustancia (78, 15,6, 7,8, 3,9, 0,8, 0,4 µg/ml) y 22 µl del medio en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos y se incuban durante 2 días a 37°C, se tratan las diluciones de T20 (39, 19,5, 3,9, 1,95, 0,78, 0,39, 0,039 nM) de la misma manera y se incuban las células durante 2 días a 37°C.

45 DÍA 4: se retiran las células del incubador y se dejan durante 10 min. a temperatura ambiente. Se retira el sobrenadante, se lavan las células tres veces con 150 µl de medio por cada pocillo y se lisan en 50 µl de tampón de lisis (2,5 ml de glicerol; 1,25 ml de MES-Tris, 25 µl de DTT 1 M, 250 µl de Triton X100, H₂O hasta 25 ml). Se dejó la placa durante 10 min. a temperatura ambiente.

50 En una placa de microtitulación blanca, se ponen 100 µl de reactivo AMR-Plus en cada pocillo y se añaden 40 µl del lisado celular (sin burbujas de aire). Se incuban la placa de microtitulación durante 2 min. a temperatura ambiente y entonces se mide en un luminómetro (Lumistar Galaxy, BMG Labtechnologies, Offenburg; ajustes: microplaca: Dynatech 96, número de intervalos: 40, tiempo del intervalo de medición: 0,25 segundos, retardo de colocación: 0,5 segundos, tiempo de medición total/pocillo: 10 segundos, ganancia: 190, intervalo de inicio: 1, intervalo de detención: 40, tipo de prueba: modo de pocillo, dirección de lectura: horizontal).

En el resultado, pudo verse que el extracto de *Ribes* podía inhibir la infección provocada por VIH. En la concentración usada, el extracto no tuvo influencias dañinas detectables sobre las células en absoluto. Esto prueba un efecto inhibitor de los extractos de *Ribes* sobre la infectividad de VIH.

REIVINDICACIONES

1. Composición para el uso en la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones virales, comprendiendo la composición un extracto acuoso de al menos una de las partes aéreas de plantas del género *Ribes*, en la que las partes aéreas se seleccionan del grupo que consiste en hojas y ramas.
- 5 2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la infección viral comprende una enfermedad de resfriado común.
3. Composición para su uso según la reivindicación 2, en la que la enfermedad de resfriado común comprende una infección primaria, provocada por rinovirus, adenovirus y/o coronavirus.
4. Composición para su uso según la reivindicación 2 ó 3 para el tratamiento de resfriados de cabeza.
- 10 5. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la infección viral comprende influenza.
6. Composición para su uso según la reivindicación 5, en la que la gripe es gripe aviar.
7. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la infección viral comprende una infección viral provocada por retrovirus.
- 15 8. Composición para su uso según la reivindicación 7, en la que la infección viral está provocada por VIH-1 o VIH-2.
9. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la planta es *Ribes nigrum* L.
10. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la planta es *Ribes rubrum* L.
- 20 11. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la composición comprende además, un extracto de los frutos de las plantas del género *Ribes*.
12. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la composición está en forma líquida, seca o semisólida.
- 25 13. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la composición se administra por vía oral, por vía intranasal o de manera tópica.
14. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que la composición está presente como un agente nasal, mezcla de inhalación, aerosol o ambientador de espray.
- 30 15. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la composición está en forma de un comprimido, comprimido recubierto, comprimido efervescente, cápsula, polvo, granulado, comprimido recubierto de azúcar, pomada, gel, crema, disolución para hacer gárgaras o zumo vegetal.
- 35 16. Uso de un extracto acuoso de al menos una de las partes aéreas de plantas del género *Ribes*, en el que las partes aéreas se seleccionan del grupo que consiste en hojas y ramas, para la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones virales.
17. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende además constituyentes de plantas o extractos de plantas del género *Cistus*.

Figura 1

PR8

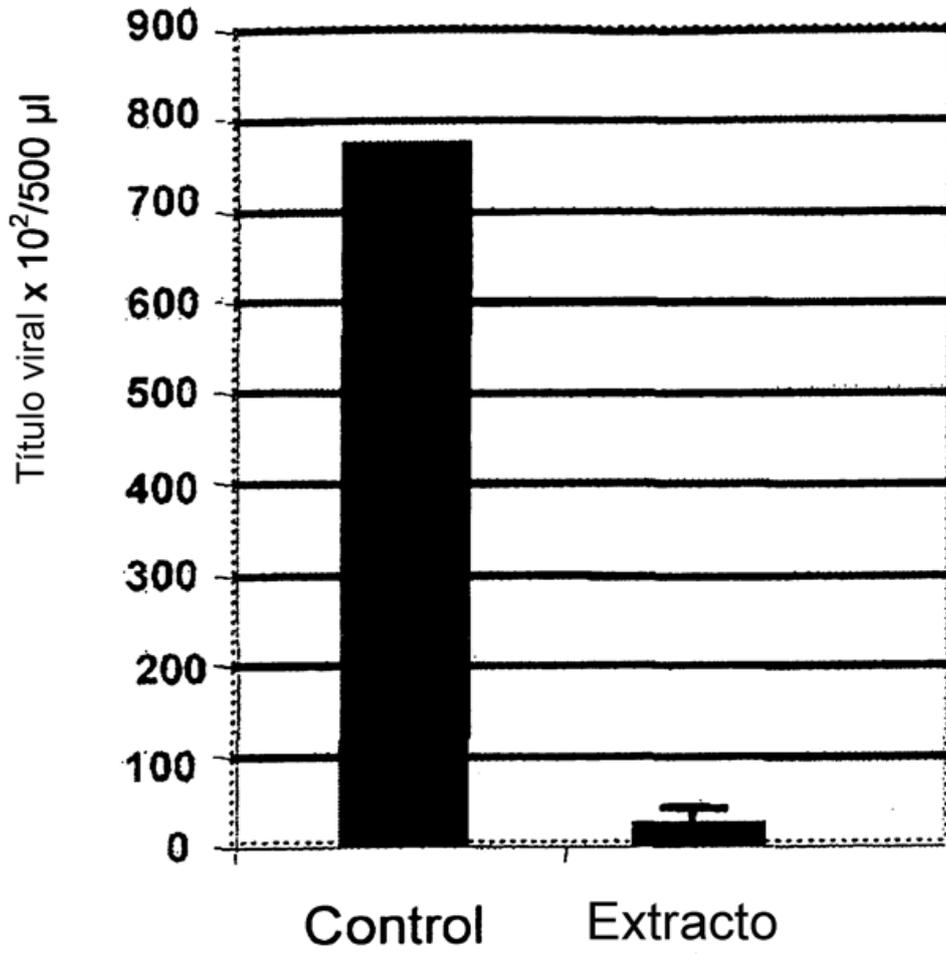


Figura 2

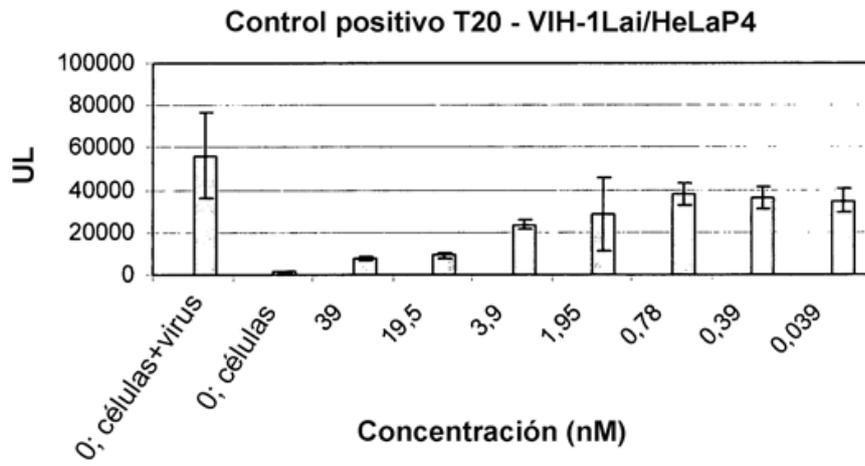
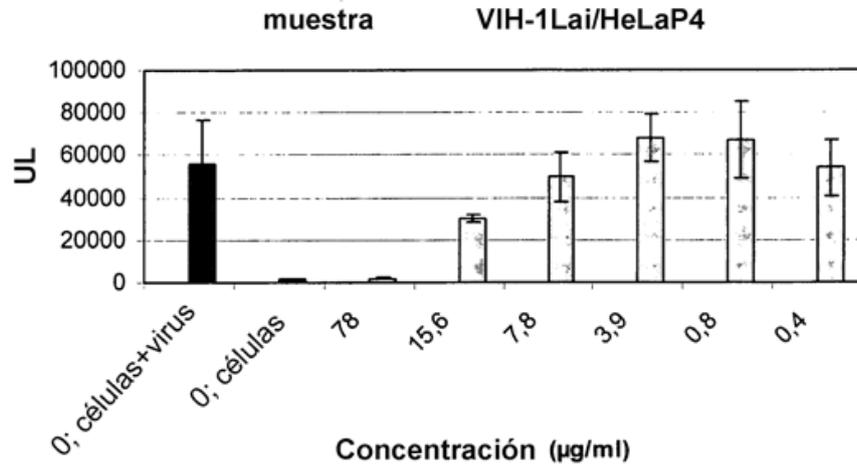


Figura 3

