

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 265**

51 Int. Cl.:

A61K 36/185 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2008 E 08858731 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013 EP 2222318**

54 Título: **Composición vírica anti-influenza que contiene extracto de corteza o tallo de Alnus japonica**

30 Prioridad:

11.12.2007 KR 20070127996

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

10.02.2014

73 Titular/es:

**RNL BIO CO., LTD. (100.0%)
1596-7 BONGCHEON-DONG
GWANAK-GU SEOUL 151-050, KR**

72 Inventor/es:

**RA, JEONG CHAN;
KWON, HYUK JOON;
KIM, BYEUNG GIE y
YOU, SEOK HYON**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 442 265 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición vírica anti-influenza que contiene extracto de corteza o tallo de *Alnus japonica*.

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una composición antivírica que comprende un extracto de *Alnus japonica*, más específicamente, se refiere a un método para preparar un extracto de la corteza de *Alnus japonica*, que presenta alta actividad vírica anti-influenza y una composición vírica anti-influenza que comprende el extracto.

Antecedentes

10 El virus de la influenza aviar pertenece a la familia orthomixoviridae y causa daño a aves de corral tales como pollo, pavo. Los virus de la influenza aviar se clasifican en 3 tipos de virus de la influenza aviar muy patogénicos, poco patogénicos y no patogénicos, según el grado de patogenicidad, entre los cuales el virus muy patogénico se clasifica como una enfermedad de la Lista A de la OIE por la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) y "una enfermedad infecciosa de los animales domésticos de la categoría 1" en la República de Corea.

15 El virus de la influenza se clasifica como tipo A, B o C según la antigenicidad de la proteína de la nucleocápside y la proteína de la matriz. Por otra parte, según la diferencia de estructura antigénica de la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), la HA se clasifica en 16 subtipos y la NA se clasifica en 9 subtipos, en la que la HA ayuda a la unión de receptores de células huésped y la fusión entre la membrana de células huésped y la cubierta vírica para causar infección por virus y la NA desempeña una función importante cuando el virus brota a través de la membrana celular después de la proliferación. Teóricamente, podían existir 144 clases de subtipos de virus por la combinación de dos proteínas.

20 La infección generalmente tiene lugar por contacto con secreciones contaminadas, además, y se puede propagar por el aire, en forma tanto de partículas como de gotitas, los pies humanos, vehículos de suministro de alimentación, aparatos y excrementos en la superficie de los huevos, etc. Aunque hay diversos síntomas según la patogenicidad del virus que infecta, en general, hay *síntomas* respiratorios, diarrea y un descenso brusco en la producción de huevos, etc. Por otra parte, en algunos casos, aparece cianosis en la región de la cabeza tal como la cresta, aparece edema en la cara o las plumas se ondulan. La tasa de mortalidad también varía de 0% a 100% según la patogenicidad, pero como los síntomas son similares a los de la Enfermedad de Newcastle, laringotraqueitis infecciosa, infección por micoplasma y similares, se requiere un diagnóstico preciso.

25 La influenza aviar muy patogénica había tenido lugar 23 veces desde 1.959 a 2.003 por todo el mundo, la mayoría de ellas fueron endémicas y contenidas. Los brotes de subtipo H5N1 de influenza aviar altamente patogénico tuvieron lugar en Corea en diciembre de 2.003, tuvieron lugar en más de 30 países incluyendo Europa, África y la mayoría de los países en el Sudeste asiático tales como Japón, China, Tailandia, Vietnam e Indonesia y así ha llegado a ser pandémica. Aunque se sabe que los seres humanos no pueden llegar a ser infectados con influenza aviar, la prevención de la influenza aviar es de importancia primordial para el sector de la salud pública desde el caso de infección humana con H5N1 en 1.997, el aislamiento de los virus de la influenza aviar H9N2 de seres humanos en 1.999 en Hong Kong y los casos humanos de infección por influenza aviar de H7 en 2.004 en Canadá. Según un informe de la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés), (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2006_06_20/en/index.html), se confirmó que habían sido infectadas 228 personas con virus del subtipo H5N1 y 130 personas de ellas murieron durante el periodo de 2.003 al 20 de junio de 2.006 en 10 países. En Corea, desde entonces había tenido lugar un brote de influenza aviar poco patogénica por virus del subtipo H9N2 en 1.996 y volvió a tener lugar en 1.999.

45 Si tiene lugar un brote de influenza aviar, en la mayoría de los países, se requiere que se desechen las aves de corral, y los países donde hayan tenido lugar brotes de influenza aviar no pueden exportar productos de aves de corral, causando así daños severos a la industria de las aves de corral. Además, cuando hay un riesgo de infección humana, los daños se extienden a toda la industria incluyendo la industria del turismo y la industria del transporte, causando así una pérdida astronómica.

50 Sustancia natural se refiere a sustancias que se tratan mínimamente sin ingredientes artificiales y las sustancias naturales clasificadas como GRAS (Reconocido Generalmente Como Seguro, por sus siglas en inglés) se pueden usar sin restricciones en la cantidad de las mismas o los alimentos en que se tienen que usar las sustancias naturales. En la industria doméstica, las sustancias naturales se clasifican como aditivos naturales y se usan como aditivos alimentarios, y en países extranjeros, se han usado como alimentos sanos y suministros médicos para el fin de los usuarios sin extralimitación, debido a su excelente funcionalidad.

Mientras tanto, *Alnus japonica* es un árbol dicotiledóneo, de hoja caduca del orden Fagales, familia Betulaceae, que se denomina comúnmente árbol *Alnus japonica*. Se distribuyen en Corea, Japón, China, etc., y se cultivan en condiciones pantanosas, su altura es aproximadamente 20 m y su corteza es de un color pardo amarotado intenso.

Su brote de invierno tiene una forma ovalada larga justo como la forma de un huevo vuelto boca abajo, que presenta tres líneas y un pedúnculo. Las hojas de *Alnus japonica* crecen alternativamente, y tienen forma ovalada, forma de huevo (más o menos redonda en los dos extremos, más ancha en el fondo) o lanceolada. Los dos lados de una hoja son lustrosos y los bordes de las hojas son en diente de sierra. Las flores de *Alnus japonica* florecen en marzo~abril, son unisexuales y forman una inflorescencia. La espina estaminada soporta flor estaminada y cada bráctea subtiende 3~4 flores. Hay cuatro periantios y cuatro estambres en cada flor. El fruto madura en octubre y se producen 2~6 frutos. Tiene forma de huevo largo y parece una piña.

Los ejemplos de patentes convencionales referentes a extractos de *Alnus japonica* incluyen una composición cosmética que contiene un extracto de *Alnus japonica* (Publicación de Patente Coreana N° 10-2003-0074500) y un método para preparar una bebida sana útil para aliviar las resacas, que comprende extractos de *Alnus japonica* y hojas de té verde (Publicación de Patente Coreana N° 10-2006-0023093), etc.

La patente internacional WO 2008/001976 A1 se refiere en general al uso de extractos de *Alnus japonica* obtenidos de las hojas, la corteza o el tallo en forma de alimento o composiciones farmacéuticas para la prevención o el tratamiento de enfermedades por el virus de la influenza.

La patente internacional WO 00/40269 A2 desvela una composición que comprende un compuesto citotóxico y un inmunoestimulante que activa o provoca una respuesta inmunitaria en un vehículo farmacéuticamente aceptable de animal huésped para suministro local.

YU YOUNG-BEOB, ET AL: "Effects of triterpenoids and flavonoids isolated from *Alnus firma* on HIV-1 viral enzymes", ARCHIVES OF PHARMACAL RESEARCH, NATL. FISHERIES UNIVERSITY, PUSAN, Corea, vol. 30, n° 7, 1 de julio de 2.007 (01-07-2.007), páginas 820-826, XP009146991, ISSN (por sus siglas en inglés): 0253-6269, DOI (por sus siglas en inglés): DOI:10.1007/BF02978831 se refieren a estudios de los efectos de los triterpenoides y flavonoides aislados de *Alnus firma* en enzimas víricas de VIH-1 y concluyen que la inhibición de la replicación vírica por extractos de metanol de hojas de *Alnus firma* se tiene que referir a la activación de la inhibición de las proteasas del éster metílico del ácido alnústico o a la activación de la inhibición de transcripción inversa por los compuestos flavanoides.

KIM JEONGDO ET AL: "Identification of differentially expressed genes in CHX cell lines with DNA microarray techniques by *Alnus japonica* (AJ) water extract", CANCER EPIDEMIOLOGY, BIOMARKERS AND PREVENTION, FILADELFIA, PA, EE.UU., vol. 11, n° 10, 1 de octubre de 2.002 (01-10-2.002), página 1219S, XP009146990, ISSN: 1.055-9.965 desvelan la identificación de genes expresados de manera diferencial en estirpes celulares de CHX con técnicas de micromatriz de ADN por extracto acuoso de *Alnus japonica*.

Recientemente, están teniendo lugar muchos intentos de investigación para desarrollar agentes antivíricos por todo el mundo. La lamibudina usada para el tratamiento de VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana)-1 y hepatitis B, el ganciclovir usado para el tratamiento de los síntomas de la infección por el virus del herpes, la ribavirina que se usa principalmente para el tratamiento de los síntomas de la infección por el virus sincitial respiratorio pero se puede usar para el tratamiento de los síntomas de diversa infección por virus cuando es una emergencia y zanamivir RELENZA™ y oseltamivir TAMIFLU™ que se sintetizan de manera artificial como inhibidores de la neuraminidasa del virus de la influenza están todos comercialmente disponibles después de obtener homologación. Sin embargo, el uso de amantadina y su análogo, rimantadina, que están homologadas para el tratamiento del virus de la influenza A, ha disminuido debido a la aparición de virus resistente y su efecto secundario. Recientemente, apareció virus resistente a oseltamivir entre los virus de la influenza aviar H5N1, por lo tanto, hay una urgente necesidad de desarrollar diversos agentes antivíricos.

Los presentes autores han confirmado actividad antivírica de extracto de metanol de *Alnus japonica* en el Registro de la Patente Coreana N° 10-0721703 y el Registro de la Patente Coreana N° 10-0769050. Sin embargo, las patentes mencionadas anteriormente presentan una desventaja de mostrar actividad antivírica solamente cuando los extractos se administraron en alta concentración y así las posibles aplicaciones de los mismos son limitadas.

Por lo tanto, los presentes autores han realizado un vasto esfuerzo para desarrollar una sustancia natural con una baja toxicidad para las células normales, al tiempo que con un excelente efecto de inhibición de la proliferación del virus de la influenza incluso cuando se administra en baja concentración, y como resultado, confirmaron que un extracto obtenido por extracción de la corteza de *Alnus japonica*, que es autóctono de Corea, con etanol al 95% a 40°C, presenta un excelente efecto del virus antiinfluenza, completando de ese modo la presente invención.

Sumario de la invención

Es un objeto principal de la presente invención proporcionar un método para preparar un extracto de la corteza de *Alnus japonica*, que presenta alta actividad vírica anti-influenza.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición alimenticia para prevenir o mejorar la infección vírica de la influenza, que comprende un extracto de la corteza de *Alnus japonica*, preparado por el método anterior.

Es otro objeto más de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica para prevenir o tratar la infección vírica de la influenza, que comprende un extracto de la corteza de *Alnus japonica*, preparado por el método anterior.

5 Para conseguir los objetos anteriores, la presente invención proporciona un método para preparar un extracto de la corteza de *Alnus japonica*, que presenta actividad vírica anti-influenza, comprendiendo el método las etapas de: (a) extraer la corteza de *Alnus japonica* autóctono coreano con etanol al 95% a 40°C y (b) recuperar la disolución de extracción resultante.

10 La presente invención también proporciona una composición alimenticia para prevenir o mejorar la infección vírica de la influenza, que comprende un extracto de la corteza de *Alnus japonica*, preparado por el método anterior, y un aditivo suplementario sitológicamente aceptable.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar la infección vírica de la influenza, que comprende un extracto de la corteza de *Alnus japonica*, preparado por el método anterior, como un ingrediente activo.

15 La presente invención también proporciona uso de un extracto de la corteza de *Alnus japonica* preparado por el método anterior para prevenir o tratar la infección vírica de la influenza.

La presente invención también proporciona un extracto de la corteza de *Alnus japonica* preparado por el método anterior para uso en un método para prevenir o tratar la infección vírica de la influenza.

20 En la presente invención, el virus de la influenza se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: virus de la influenza humana, virus de la influenza porcina, virus de la influenza equina y virus de la influenza aviar. Preferiblemente, el virus de la influenza aviar es KBNP-0028 (KCTC 10866BP).

Otras características y ejemplos de la presente invención se aclararán más a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas.

25 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar un extracto de la corteza de *Alnus japonica*, que presenta actividad vírica anti-influenza, comprendiendo el método las etapas de: (a) extraer la corteza de *Alnus japonica* autóctono coreano con etanol al 95% a 40°C y (b) recuperar la disolución de extracción resultante.

En una realización de la presente invención, después de pulverizar y extraer la corteza de *Alnus japonica* con agua o etanol por extracción con agua caliente, extracción con agua fría, extracción por refrigeración con reflujo o extracción por ultrasonidos, se centrifugó después, obteniéndose así un extracto de la corteza de *Alnus japonica*.

30 En la presente invención, después de añadir una composición que contiene un extracto de la corteza de *Alnus japonica* a huevos embrionados SPF infectados con virus de la influenza aviar y cultivados, se realizó el ensayo de hemaglutinación en placa, y como resultado, se confirmó que la composición que contenía un extracto de la corteza o tallo de *Alnus japonica* presenta excelente efecto vírico anti-influenza incluso cuando se administra en baja concentración.

35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso en un método para prevenir o tratar la infección vírica de la influenza (enfermedad vírica de la influenza), que comprende un extracto de la corteza de *Alnus japonica*, preparado por el método anterior, como un ingrediente activo.

40 En la presente invención, el virus de la influenza se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: virus de la influenza humana, virus de la influenza porcina, virus de la influenza equina y virus de la influenza aviar. Más preferiblemente, el virus de la influenza aviar es KBNP-0028 (KCTC 10866BP).

El extracto inventivo de la corteza de *Alnus japonica* es una sustancia natural y así no presenta toxicidad, que permite la administración a largo plazo en alta dosis como producto médico.

45 Se puede preparar una composición que comprende el extracto inventivo de la corteza de *Alnus japonica* por mezcla junto con agentes farmacéuticos tales como agentes antihistamínicos, agentes analgésicos anti-inflamatorios, antineoplásicos y antibióticos o se puede usar en asociación con los mismos.

La composición de la presente invención en formas farmacéuticas se puede usar en forma de sales farmacéuticamente aceptables, y también se puede usar sola o en la asociación apropiada, así como en asociación con otros compuestos farmacéuticamente activos.

50 La composición farmacéutica que comprende el extracto inventivo se puede formular en una preparación oral tal como: polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones, jarabes, aerosoles, etc, una preparación externa, un supositorio y una disolución inyectable estéril, según los métodos convencionales de preparación. La

composición farmacéutica que comprende el extracto inventivo puede comprender: portadores, excipientes y diluyentes, y ejemplos de portadores, excipientes y diluyentes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábica, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite de parafina.

La composición de la presente invención se puede formular en una forma de preparación, junto con los diluyentes o excipientes convencionales tales como: cargas, extendedores, aglutinantes, agentes humectantes, disgregantes, tensioactivos, etc. Una preparación sólida para administración oral incluye: comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas, etc., y la preparación sólida se formula mezclando el extracto con al menos un excipiente, por ejemplo, almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa, gelatina y similares. También, se usa un lubricante tal como estearato de magnesio y talco además de los excipientes. Una preparación líquida para administración oral incluye: suspensión, ziperol, emulsión, jarabe y similares y pueden estar contenidos en la misma diversos excipientes, por ejemplo, agentes humectantes, saborizantes, fragancias, conservantes, etc., además de diluyentes convencionales tales como agua y parafina líquida. Una preparación para administración parenteral incluye disolución acuosa estéril, disolución no acuosa, suspensiones, emulsiones, una preparación liofilizada y supositorios. Ejemplos de disolución no acuosa y suspensiones incluyen aceite vegetal tal como propilenglicol, polietilenglicol y aceite de oliva y ésteres inyectables tales como oleato de etilo y similares. Los materiales de base de supositorios incluyen witepsol, macrogol, tween 60, manteca de cacao, manteca de laurina, glicerol-gelatina y similares.

Aunque la dosis del extracto según la presente invención varía dependiendo del peso y el estado de un paciente, la importancia de la enfermedad, la forma farmacéutica, la vía de administración y el periodo de tratamiento, la dosis se puede determinar apropiadamente por un experto en la materia. Sin embargo, para conseguir el efecto deseado, el extracto inventivo se administra en una dosis de 0,01-200 mg/kg al día, preferiblemente 0,1-100 mg/kg al día. Las dosis anteriores se pueden administrar como una sola dosis o se pueden dividir en dosis múltiples al día y las dosis no limitan el alcance de la presente invención de ninguna manera.

El extracto inventivo se puede administrar a mamíferos incluyendo ratas, ratones, animales domésticos, seres humanos y similares por diversas rutas. El modo de administración puede incluir, por ejemplo, administración oral y rectal o inyecciones venosa, muscular, subcutánea, endometrial o intracerebroventricular.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición alimenticia para prevenir o mejorar la infección vírica de la influenza, que comprende un extracto de la corteza de *Alnus japonica*, preparado por el método anterior, y un aditivo suplementario sitológicamente aceptable.

En una realización de este aspecto, el virus de la influenza se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: virus de la influenza humana, virus de la influenza porcina, virus de la influenza equina y virus de la influenza aviar. Más preferiblemente, el virus de la influenza aviar es KBNP-0028 (KCTC 10866BP).

La composición que comprende el extracto inventivo o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo se puede usar como ingrediente principal, aditivo alimentario y suplemento cuando se preparan diversos alimentos funcionales y alimentos funcionales sanos.

En la presente invención, el término "alimentos funcionales" se refiere a un alimento cuya funcionalidad mejora añadiendo el extracto inventivo al mismo. La funcionalidad se puede dividir ampliamente en funcionalidad física tal como funcionalidad fisiológica de sabores sintéticos y sabores naturales. Cuando se añade el extracto inventivo a un alimento general, tal como sabores sintéticos y sabores naturales y la funcionalidad fisiológica del mismo se mejorará. Por lo tanto, en la presente invención, el alimento con funcionalidad mejorada se define extensamente como alimentos funcionales.

Aparte de lo anterior, el extracto inventivo puede contener diversos nutrientes, vitaminas, minerales (electrolitos), sabores tales como sabores sintéticos y sabores naturales, materias colorantes, potenciador (queso, chocolate, etc.) ácido péctico y sus sales, ácido algínico y sus sales, ácidos orgánicos, espesantes coloides protectores, agentes de control del pH, estabilizantes, conservantes, glicerinas, alcoholes y agentes de carbonatación para uso en bebida carbonatada, etc. Además, el extracto de la presente invención puede contener zumos de fruta naturales y pulpas de fruta para suministro de bebidas de zumos de fruta y bebidas de verduras. Estos ingredientes se pueden usar de manera independiente o combinados. La proporción de estos aditivos no es así crítica, pero generalmente se selecciona del intervalo de 0,01~20 partes en peso basado en 100 partes en peso del extracto inventivo.

Ejemplos

De ahora en adelante, la presente invención se describirá con más detalle por los ejemplos. Sin embargo, es evidente para un experto en la materia que estos ejemplos son para fin ilustrativo solamente y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Preparación de extracto de *Alnus japonica*.

1-1: Preparación de disolvente de extracción y extracción a diversas temperaturas.

La corteza de *Alnus japonica* autóctono coreano adquirida en Kyungdong market, Seúl, Corea, se secó a temperatura ambiente durante 24 h, finamente cortada y pulverizada. Se extrajo 1 kg de los fragmentos de corteza obtenidos con 10 l de etanol al 95% con reflujo durante 8 h a 40°C, 60°C y 80°C o se extrajo con 10 l de agua con reflujo durante 4 h a 100°C y se filtró a vacío para recoger sobrenadante, seguido por elución de sustancias útiles de los fragmentos obtenidos. Las sustancias útiles eluidas se secan a vacío durante 24 h para obtener 100 g de polvo de *Alnus japonica* y se disolvió el polvo obtenido en disolución al 99,9% de dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 20 mg/ml, después se usó para los experimentos siguientes.

Para experimentos de comparación, extractos de corteza de *Alnus japonica* preparados por el método en el ejemplo 1 del Registro de la Patente Coreana N° 10-0721703 y el Registro de la Patente Coreana N° 10-0769050 (una composición antivírica que comprende extractos de *Alnus japonica*), como un grupo de control.

1-2: Preparación de extractos de *Alnus japonica* usando *Alnus japonica* de diferentes orígenes.

La corteza y el tallo de *Alnus japonica* autóctono coreano adquiridos en Kyungdong market, Seúl, Corea y la corteza de *Alnus japonica* originario de China adquirida en Yanbian market en China se secaron a temperatura ambiente durante 24 h, finamente cortados y pulverizados. Se extrajo 1 kg de los fragmentos de *Alnus japonica* obtenidos con 10 l de etanol al 80% y etanol al 95% con reflujo a 40°C, respectivamente, y se filtraron a vacío para recoger sobrenadante, seguido por elución de sustancias útiles de los fragmentos obtenidos. Las sustancias útiles eluidas se secan a vacío durante 24 h para obtener 100 g de polvo de *Alnus japonica* y el polvo obtenido se disolvió en disolución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 99,9% a una concentración de 20 mg/ml, usada después para los experimentos siguientes.

Ejemplo 2: Examen de efecto anti-vírico de extractos de *Alnus japonica*.

2-1: Preparación de KBNP-0028.

Como virus de la influenza aviar usado en el experimento, se usó KBNP-0028 hiperproliferativo (KR 2006-0026591) clonado después de subcultivar virus A /pollo/Corea/SNU0028/2000(H9N2) (se aísla en Corea en 2.000) en embrión de pollo. Esto es, SNU0028 [A/pollo/Corea/SNU0028/2000(H9N2)]; el aislamiento e informe para el Servicio Nacional de Cuarentena e Investigación Veterinaria, 9 de mayo de 2.005] es virus de la influenza aviar poco patogénico de subtipo H9N2 y es aislado de pollos que muestran mortalidad y síndrome de descenso de producción de huevos en una granja de pollos situada en la Provincia de Jeolla del Norte el 28 de enero de 2.000. El método de aislamiento es como sigue: después de disolver muestras de riñón y tráquea de pollos infectados, se suspenden en tampón de fosfato y se filtran con papel de filtro de 0,45 µm, se inocula cada muestra en tres cavidades alantoideas de huevo embrionado SPF (Sin Patógeno Específico, por sus siglas en inglés) (Sunrise Co., NY), y se cultivan a 37°C para obtener fluido alantoideo. Se extrajeron 20 µl del fluido alantoideo y 20 µl de glóbulos rojos de pollo al 0,1%, de un pollo nacido del huevo embrionado SPF, se pusieron con cuentagotas en una placa de vidrio y se mezclaron para efectuar el ensayo de hemaglutinación en placa.

Como resultado, en todos los fluidos alantoideos, obtenidos por inoculación de la muestra de riñón y la muestra de tráquea, tuvo lugar hemaglutinación. El virus se identificó con RT-PCR usando cebador específico de H9N2 y análisis de secuencias de bases (Kim Min Chul, Master's Thesis, 2.002, Seoul National University), y se almacenó a -70°C. Entre ellos, el virus aislado de la muestra de tráquea se usó en el experimento.

Para seleccionar una cepa de vaccinia con alta productividad en huevos embrionados, el SNU0028 se diluyó con una disolución de tampón de fosfato a una concentración de 0,05 a 0,5 HAU/ml y se inocularon 200 µl de la disolución diluida en la cavidad alantoidea de huevos embrionados SPF de 10-11 días (Sunrise Co., NY), después se cultivaron durante tres días a 37°C. Cada día, los huevos embrionados, que murieron hacia tres días, se desecharon por examen de los huevos por la mañana y por la tarde. Los huevos embrionados, que sobrevivieron tres días, se almacenaron durante 12~24 h a 4°C, de cuyo fluido alantoideo se recogieron para medir el volumen y el título de la hemaglutinación de cada huevo. Entre ellos, el fluido alantoideo con la mayor cantidad y el título más alto de hemaglutinación se inoculó en huevos embrionados usando el mismo método que se describió anteriormente y se subcultivó 19 veces para seleccionar fluido alantoideo cuya productividad se aumentó mostrando alto título de hemaglutinación y alto rendimiento de la misma y así la cepa se denominó KBNP-0028 y se depositó en GenBank situado en Eoeundong, Youseonggu, Daejeon city, Corea el 26 de octubre de 2.005 (KCTC 10866BP).

2-2: Cultivo de fragmentos de cáscara de huevo embrionado.

La cáscara de huevo de huevos embrionados SPF (Sunrise Co., NY) de 10~11 días se lavó con etanol al 70% y se retiraron el embrión de pollo y todos los fluidos corporales. Se cortó la cáscara de huevo resultante en trozos de aproximadamente 8 mm de largo y 8 mm de ancho mientras se mantenían vellosidades y alantoides adheridos a la superficie interna de la cáscara de huevo y se añadió cada trozo a una placa de cultivo de 24 pozos. Se preparó medio de cultivo por (i) mezcla de medio 199 (GIBCO-BRL, NY, USA) con medio F10 (GIBCO-BRL, NY, USA) en una relación de 1:1, (ii) adición de 0,075% de bicarbonato de sodio y 100 µg/ml de gentamicina.

5 Los huevos embrionados SPF de 10~11 días (Sunrise Co., NY) se infectaron con virus añadiendo 100 µl de los fluidos alantoideos brutos, KBNP-0028 preparado en el Ejemplo 2-1, que se diluye 4~10 veces, a las vellosidades y alantoides de fragmentos de cáscara de huevos embrionados y cultivándose durante 30 min a 37°C, y se les añadieron 1.000 µl del medio de cultivo, después se añadieron extractos de *Alnus japonica* preparados en el Ejemplo 1-1 y Ejemplo 1-2 a placas de 6 pozos a diversa concentración, respectivamente, seguido por cultivo durante 7 días a 37°C.

2-3: Ensayo de efecto antivírico.

10 Se tomó caldo de cultivo de dichos fluidos infectados con virus cultivado durante 7 días en el Ejemplo 2-2, al que se añadieron extractos de *Alnus japonica* a diversas concentraciones, para efectuar ensayo de hemaglutinación en placa. Se pusieron con cuentagotas 25 µl del caldo de cultivo y 25 µl de glóbulos rojos de pollo (0,1%) en una placa de vidrio y se mezclaron uniformemente. Se determinó la proliferación de virus según si tenía lugar hemaglutinación en 2 min moviendo la placa de vidrio a derecha e izquierda y arriba y abajo.

Tabla 1

Control		Disolvente del extracto	Extractos de <i>Alnus japonica</i> (µg/ml)			
virus	no virus		400	200	100	50
6/6	0/6	80°C, etanol al 95%*	0/6	0/6	2/6	5/6
		60°C, etanol al 95%*	0/6	0/6	2/6	5/6
		40°C, etanol al 95%	0/6	0/6	1/6	3/6
		100°C, agua	1/6	4/6	6/6	6/6
		Metanol al 99,9%	0/6	2/6	6/6	-

* ejemplos de referencia

15 Como resultado, como se muestra en la Tabla 1, en la muestra a la que se añadió extracto acuoso a 100°C como control negativo, tuvo lugar hemaglutinación en una de las 6 muestras de ensayo a 400 µg/ml, mostrando efecto antivírico parcial, sin embargo, se mostró actividad de hemaglutinación en las 6 muestras de ensayo a 50 µg/ml y 100 µg/ml, que sugiere que la proliferación de virus no estaba inhibida.

20 Por otra parte, en la muestra a la que se añadió el extracto de etanol al 95% (a 80°C), no tuvo lugar hemaglutinación en las 6 muestras de ensayo a 400 µg/ml y 200 µg/ml, que muestra que la proliferación de virus estaba completamente inhibida, tuvo lugar hemaglutinación en dos de 6 muestras de ensayo a 100 µg/ml, que muestra efecto antivírico parcial, y tuvo lugar hemaglutinación en cinco de 6 muestras de ensayo a 50 µg/ml, que muestra efecto antivírico débil. La muestra a la que se añadió extracto de etanol al 95% (a 60°C) mostró los mismos resultados de hemaglutinación que los del extracto de etanol al 95% (a 80°C). El extracto de etanol al 95% (a 40°C) mostró la misma hemaglutinación que las de los extractos de etanol al 95% (a 80°C, 65°C, respectivamente) a 400 µg/ml y 200 µg/ml, y así, no se mostró actividad de hemaglutinación en todas las muestras, que sugiere que la proliferación vírica estaba completamente inhibida y mostró efecto antivírico parcial tuvo lugar hemaglutinación en una de 6 muestras de ensayo a 100 µg/ml y tres de 6 muestras de ensayo a 50 µg/ml, que confirma así que el extracto muestra un alto efecto antivírico incluso a baja concentración.

30 Basándose en concentración de extracto de 100 µg/ml, la actividad antivírica en diversos disolventes fue en el orden: extracto de etanol al 95% (a 40°C) > extracto de etanol al 95% (a 80°C) y extracto de etanol al 95% (a 60°C) > extracto acuoso (a 100°C). Por lo tanto, se determinó que el extracto de *Alnus japonica* al 95% (a 40°C) es lo más adecuado como el extracto de *Alnus japonica* para preparar la composición antivírica inventiva.

35 Para comparar los efectos antivíricos según *Alnus japonica* con diferentes orígenes, extraídos a 40°C a la que se mostró el efecto de inhibición más alto en proliferación de virus y diversos disolventes de extractos, se realizó el mismo experimento que se describió anteriormente en las condiciones mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2

Control		Materias primas que se tienen que extraer y disolventes	Extractos de <i>Alnus japonica</i> (µg/ml)			
virus	no virus		100	50	25	12,5
6/6	0/6	la corteza de <i>Alnus japonica</i> originario de Corea - extracto de etanol al 80% *	2/6	4/6	6/6	6/6
		la corteza de <i>Alnus japonica</i> originario de Corea - extracto de etanol al 95%	1/6	3/6	4/6	5/6
		el tallo de <i>Alnus japonica</i> originario de Corea - extracto de etanol al 80%*	3/6	5/6	6/6	6/6
		el tallo de <i>Alnus japonica</i> originario de Corea - extracto de etanol al 95%*	1/6	3/6	6/6	6/6
		la corteza de <i>Alnus japonica</i> originario de China - extracto de etanol al 80% *	1/6	4/6	6/6	6/6
		la corteza de <i>Alnus japonica</i> originario de China - extracto de etanol al 95% *	1/6	5/6	6/6	6/6

* ejemplos de referencia

5 Como resultado, como se muestra en la Tabla 2, se observó que los extractos de etanol al 80% y al 95% de la corteza de de *Alnus japonica* autóctono coreano mostraron excelente actividad antivírica, comparado con los extractos de etanol al 80% y 95% del tallo de *Alnus japonica* autóctono coreano. Así, se pudo confirmar que la corteza era adecuada para uso como extracto de *Alnus japonica* para la composición antivírica inventiva.

10 Cuando se compara *Alnus japonica* de diferentes orígenes, los extractos de etanol al 80% de la corteza de *Alnus japonica* autóctono coreano y *Alnus japonica* autóctono chino mostraron actividad similar y el extracto de etanol al 95% de la corteza de *Alnus japonica* originario de Corea mostró actividad más excelente que la de extracto de etanol al 95% de *Alnus japonica* originario de China y cuando se comparan actividades antivíricas en diversos disolventes del extracto, el extracto de etanol al 95% mostró mayores actividades antivíricas que la del extracto de etanol al 80%.

De los resultados anteriores, se pudo confirmar que el extracto de etanol al 95% de la corteza de *Alnus japonica* originario de Corea extraído a 40°C mostró el efecto antivírico más excelente.

15 De ahora en adelante, ejemplos de preparaciones de la composición farmacéutica que comprenden un extracto de *Alnus japonica* según la presente invención, sin embargo, estos ejemplos son para fin ilustrativo solamente y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo de preparación 1: preparación de polvo.

Extracto de *Alnus japonica*: 20 mg

20 Lactosa: 100 mg

Talco: 10 mg

Se mezclaron los ingredientes anteriores y se cambiaron en un paquete impermeable al aire para preparar una preparación de polvo.

Ejemplo de preparación 2: preparación de comprimidos.

Extracto de *Alnus japonica*: 10 mg

Almidón de maíz: 100 mg

Lactosa: 100 mg

5 Estearina magnesio: 2 mg

Se mezclaron los ingredientes anteriores y se comprimieron según el método convencional para preparar comprimidos.

Ejemplo de preparación 3: preparación de cápsulas.

Extracto de *Alnus japonica*: 20 mg

10 Celulosa cristalina: 13,3 mg

Lactosa: 65,8 mg

Estearato de magnesio: 0,9 mg

Se mezclaron los ingredientes anteriores y se cambiaron en una cápsula de gelatina según el método convencional para preparar cápsulas.

15 Ejemplo de preparación 4: Preparación de inyecciones

Extracto de *Alnus japonica*: 10 mg

Manitol: 180 mg

Agua destilada estéril para inyección: 2.974 mg

Na₂HPO₄.12H₂O: 26 mg

20 Los ingredientes anteriores se añadieron a una ampolla en la cantidad mostrada anteriormente por ampolla (3 ml) según el método convencional de preparación de disolución inyectable.

Ejemplo de preparación 5: preparación líquida.

Extracto de *Alnus japonica*: 20 mg

Azúcar isomerizada: 10 g

25 Manitol: 5 g

Cantidad apropiada de agua purificada.

Cada ingrediente se disolvió en el agua purificada y se añadió una cantidad adecuada de sabor de limón para mezclar los ingredientes anteriores, después se añadió el agua purificada a un volumen total de 100 ml, seguido por esterilización para cambio en un vial pardo, preparando así preparación líquida, según el método de preparación de líquidos convencional.

30

Aplicabilidad industrial

Como se describió anteriormente con detalle, el extracto de la corteza o tallo de *Alnus japonica* según la presente invención presenta baja toxicidad para células corioalantoideas que es una célula normal, al tiempo que tiene un excelente efecto antivírico incluso cuando se administra en baja concentración. Por lo tanto, la composición que comprende el extracto de *Alnus japonica* se puede usar con eficacia en prevenir y tratar la infección vírica de la influenza.

35

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un extracto de la corteza de *Alnus japonica*, que presenta una actividad vírica anti-influenza, comprendiendo el método las etapas de:
 - a) extraer la corteza de *Alnus japonica* autóctono coreano con etanol al 95% a 40°C y
 - b) recuperar la disolución de extracción resultante a la misma temperatura por concentración y secado a vacío.
2. Una composición alimenticia para prevenir o mejorar la infección vírica de la influenza, que comprende un extracto de la corteza de *Alnus japonica*, preparado por el método de la reivindicación 1 y un aditivo suplementario sitológicamente aceptable.
3. La composición según la reivindicación 2, en la que dicho virus de la influenza se selecciona del grupo que consiste en: virus de la influenza humana, virus de la influenza porcina, virus de la influenza equina y virus de la influenza aviar.
4. La composición según la reivindicación 3, en la que dicho virus de la influenza aviar es KBNP-0028 (KCTC 10866BP).
5. Una composición farmacéutica para uso en un método para prevenir o tratar la infección vírica de la influenza, que comprende un extracto de la corteza de *Alnus japonica*, preparado por el método de la reivindicación 1, como un ingrediente activo.
6. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, en la que dicho virus de la influenza se selecciona del grupo que consiste en: virus de la influenza humana, virus de la influenza porcina, virus de la influenza equina y virus de la influenza aviar.
7. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 6, en la que dicho virus de la influenza aviar es KBNP-0028 (KCTC 10866BP).