(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 529 705**

(51) Int. CI.:

A61K 31/353 (2006.01)
A61K 36/54 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01)
A61K 36/77 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2009 E 09848235 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2328575**

(54) Título: **Composición normalizada novedosa, método de fabricación y uso en la resolución de infección por virus ARN**

(30) Prioridad:

11.08.2009 IN MU18572009

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.02.2015

(73) Titular/es:

INDUS BIOTECH PRIVATE LIMITED (100.0%)
1 Rahul Residency, Plot Nos. 6 & 7, Off Salunke Vihar Road, Kondhwa
Pune 411 048, Maharashtra , IN

(72) Inventor/es:

BHASKARAN, SUNIL y
VISHWARAMAN, MOHAN

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

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 normalizada novedosa, método de fabricación y uso en la resolución de infección por virus ARN

Campo técnico

La presente divulgación se refiere a preparaciones antivirales. La divulgación proporciona preparaciones antivirales obtenidas a partir de plantas y que mejoran la respuesta inmunitaria y se encuentra que son eficaces frente a infección por VIH, SIDA y virus influenza e infección.

Antecedentes

Las catequinas son metabolitos polifenólicos de plantas que pertenecen a la familia de flavonoides. La fórmula molecular y el peso de las catequinas son $C_{15}H_{14}O_6$ y 290 g/mol. La catequina y la epicatequina son epímeros, siendo (-)-epicatequina y (+)-catequina los isómeros ópticos más comunes encontrados en la naturaleza.

Las procianidinas o taninos condensados son oligómeros de flavonoides cuyos elementos estructurales son (+)-catequina y (-)-epicatequina. Son productos finales oligoméricos de la ruta de biosíntesis de flavonoides y ahora se identifican y reconocen por sus efectos beneficiosos en los seres humanos. Están presentes abundantemente en el reino vegetal en frutos, cortezas, hojas y semillas en las que proporcionan protección frente a la luz, la oxidación y los depredadores. Las procianidinas se encuentran en muchas plantas, principalmente manzanas, corteza de pino, corteza de canela, pericarpio del lichi, cacahuetes, semilla de uva, cacao, piel de uva, mirtilo, arándano, grosella negra, té verde y té negro.

Basándose en la unión entre unidades monoméricas sucesivas, las procianidinas se clasifican como polifenoles de tipos A, B o C.

Generalmente la unión entre unidades monoméricas sucesivas de procianidinas es entre la 4ª posición de la unidad “superior” y la 8ª posición de la unidad “inferior”, conduciendo a una procianidina de tipo B. Alternativamente, la unión puede producirse entre C_4 de la unidad “superior” y C_6 de la unidad inferior, conduciendo a una procianidina de tipo C. Los polifenoles de tipo B y C se observan abundantemente en muchas fuentes botánicas. Cuando las unidades monoméricas sucesivas se unen mediante un enlace éter entre C_2 y C_4 de la unidad “superior” y el oxígeno en la posición C_7 y las posiciones C_6/C_8 (respectivamente) de la unidad inferior, se forma una procianidina de tipo A. Las procianidinas de tipo A se observan con poca frecuencia en comparación con los polifenoles de tipo B y C.

Respuesta inmunológica frente a un antígeno

El sistema inmunitario es una colección de mecanismos dentro de un huésped que le protege frente a enfermedades identificando y eliminando el patógeno. La respuesta del sistema a un patógeno comienza desde la identificación de una proteína foránea hasta la destrucción final de la fuente de esta proteína foránea protegiendo así al huésped. Incluso el reconocimiento de una proteína sencilla de un organismo unicelular implica una serie de etapas complejas que conducen a la eliminación final del organismo del huésped. Este proceso completo es la respuesta inmunológica frente a la presencia de una proteína foránea o el antígeno. La resolución de infección por el sistema inmunitario es la respuesta inmunológica frente al antígeno, y puede dividirse en 3 fases:

Activación y movilización: Se activan glóbulos blancos (WBC) cuando identifican una molécula foránea o un antígeno. Células inmunitarias tales como macrófagos y células T liberan sustancias que atraen a otras células inmunitarias al sitio de la molécula foránea identificada y por tanto movilizan la miríada de células inmunitarias para erradicar el patógeno.

Regulación: La respuesta inmunitaria provocada debe controlarse con el fin de prevenir un daño excesivo al huésped. Linfocitos T reguladores facilitan el control de las respuestas inmunitarias secretando citocinas que actúan como mensajeros del sistema inmunitario y por tanto regulan una respuesta inmunitaria exagerada.

Resolución: La resolución de la infección implica confinar el patógeno y eliminarlo del organismo. Tras eliminarse el patógeno, la mayoría de los WBC se destruyen, los que quedan se denominan “células de memoria” y protegen al huésped frente a una infección futura por el mismo patógeno provocando una respuesta inmunitaria temprana frente al patógeno.

Un patógeno provoca satisfactoriamente una infección cuando el huésped no puede montar una defensa lo bastante fuerte como para eliminar el patógeno. En tales casos los anticuerpos producidos por el huésped son insuficientes para neutralizar los números existentes del antígeno. Por tanto, los antígenos libres infectan satisfactoriamente al huésped. En tales casos, se usan ayudas externas tales como antibióticos y antivirales para reducir los números del antígeno. Una vez reducidos los números de antígeno, la respuesta inmunológica es suficiente para eliminar el patógeno.

Infección por VIH y SIDA:

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es un retrovirus que destruye el sistema inmunitario. Esta infección

puede conducir eventualmente al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), un estado grave y potencialmente mortal en el que el sistema inmunitario no logra funcionar apropiadamente. El VIH infecta principalmente a células específicas en el sistema inmunitario humano: linfocitos T "cooperadores" (específicamente células T $CD4^+$), macrófagos y células dendríticas. Cuando los números de células T $CD4^+$ disminuyen por debajo de un nivel crítico, se pierde la inmunidad mediada por células, y el organismo se vuelve progresivamente más propenso a infecciones oportunistas.

Ciclo de vida del VIH: Una vez que el VIH ha entrado en el huésped, el VIH necesita células huésped específicas para facilitar su replicación y propagación. La célula huésped en el caso del VIH es la célula T o la célula CD4.

1. Reconocimiento de huésped y unión: El VIH busca células CD4 y se une a ellas mediante un sistema de "cerradura y llave" mediante correceptores en la superficie celular. Proteínas en la superficie del VIH se unen a proteínas complementarias en la célula CD4.

2. Unión y entrada en el huésped: Tras la unión, el VIH inyecta proteínas virales en los fluidos celulares (citoplasma) de la célula T. Esto provoca una fusión de la membrana celular con la envuelta exterior del VIH.

3. Desensamblaje de proteínas virales: Con el fin de usar su material genético (ARN) para la reproducción, la cubierta protectora que rodea al ARN debe disolverse. Sin esta etapa, la conversión de ARN en ADN (los elementos estructurales de nuevas copias de VIH) no puede tener lugar, y la replicación se detiene.

4. Transcripción inversa: Una vez dentro de la célula, el ARN de cadena sencilla del VIH debe convertirse en el ADN de cadena doble. Esta etapa se provoca mediante la enzima transcriptasa inversa. La transcriptasa inversa usa elementos estructurales de la célula T para ayudar a convertir el ARN viral en ADN. El ADN contiene la información genética necesaria para la replicación del VIH.

5. Replicación y ensamblaje para dar un nuevo virión: Con el fin de replicarse, el ADN viral recién formado debe integrarse en el núcleo huésped. Aún no se entiende completamente este proceso, pero se cree que está ayudado por proteínas de transporte virales. Al integrarse, el virus gesta mientras la célula huésped prepara las proteínas que requiere para completar la replicación. Una vez que los materiales están disponibles, se escinden por el virus basándose en el requerimiento y la estructura y posteriormente se ensamblan para dar un nuevo VIH. Este proceso se ve ayudado por la enzima proteasa.

6. Gemación a partir de la célula huésped: La etapa final del ciclo de replicación viral se denomina gemación. Con su material genético guardado y una nueva cubierta exterior preparada a partir de la membrana de la célula CD4 huésped, el VIH recién formado se desprende y entra en la circulación, listo para comenzar de nuevo todo el proceso.

Intervenciones actuales:

Los métodos actuales de interrupción de la replicación y propagación del VIH incluyen: inhibidores de la entrada viral; inhibidores de la fusión de membrana; e inhibidores de la transcriptasa inversa; inhibidores de la integrasa; inhibidores de la proteasa; inhibidores de la maduración, etc. La FDA ha aprobado varios fármacos para tratar la infección por VIH. La mayoría de estos fármacos funcionan mediante su mecanismo de acción antirretroviral (ARV).

La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) presenta desafíos políticos, económicos, de salud pública, sociales y científicos a naciones en todo el mundo. A finales de 2007, se estimaba que 33,2 millones de personas vivían con VIH/SIDA a nivel mundial. Por tanto, existe una necesidad urgente del manejo y/o el tratamiento de esta enfermedad con fármacos más seguros y más eficaces. Un desafío adicional que presenta este virus es la propensión a la mutación. Las proteínas virales de VIH son propensas a la mutación y por tanto las cepas resistentes a fármacos plantean una amenaza adicional que crea una necesidad de nuevas clases de fármacos.

Virus influenza:

La gripe es una enfermedad infecciosa provocada por virus ARN de la familia *Orthomyxoviridae* (los virus influenza), que afecta a aves y a mamíferos. La infección por este virus afecta principalmente a la nariz, garganta, bronquios y, ocasionalmente, pulmones.

Estructura del virus influenza: El virus influenza se clasifica en 3 categorías: virus influenza A, B y C. Los 3 subtipos de virus influenza tienen una estructura global muy similar. Los virus están compuestos por una envuelta viral que contiene dos tipos principales de glicoproteínas que rodean un núcleo central. El núcleo central contiene el genoma de ARN viral y otras proteínas virales que empaquetan y protegen este ARN. La hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) son las dos glicoproteínas grandes en el exterior de las partículas virales.

Virus influenza A: Los virus de tipo A son los patógenos humanos más virulentos entre los tres tipos de influenza y provocan la enfermedad más grave. El virus influenza A puede subdividirse en diferentes serotipos basándose en la respuesta de anticuerpos a estos virus. Los serotipos que se han confirmado en seres humanos, ordenados por el número de muertes pandémicas de seres humanos conocidas, son: H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2,

H7N2, H7N3, H10N7. Los virus influenza A han provocado varias pandemias durante el último siglo, y siguen provocando pandemias anuales. La aparición de nuevas cepas de influenza continúa planteando desafíos para la salud pública y las comunidades científicas. El virus H1N1 es un serotipo del virus influenza A y es una de las cepas más virulentas que se sabe que afecta a seres humanos. El serotipo H1N1 fue responsable de millones de muertes en 1918 (gripe española) y está provocando más recientemente una pandemia mundial de gripe porcina.

Ciclo de vida de virus influenza: A continuación se explica resumidamente el proceso de replicación y propagación de virus influenza:

1. Reconocimiento de huésped y unión: Unión del virus a la célula huésped usando la proteína HA a ácido siálico unido a azúcares en las superficies de células epiteliales. Las células epiteliales están normalmente presentes en la nariz, garganta y pulmones de mamíferos y en los intestinos de aves.

2. Unión y entrada en el huésped: Tras la unión, se escinde la proteína HA y el virus entra en la célula mediante endocitosis.

3. Desensamblaje de proteínas virales: Una vez que el virus entra en la célula, el pH y las condiciones ambientales del endosoma conducen a

a. Una parte de HA fusiona la envuelta viral con la membrana de la vacuola

b. El canal de iones M2 permite la entrada de protones en el núcleo viral lo cual acidifica el núcleo viral conduciendo a su desensamblaje y la posterior liberación del ARN viral y proteínas del núcleo en el citoplasma de la célula huésped

4. Transcripción inversa: Ahora se transportan el ARN viral y las proteínas del núcleo al interior del núcleo de la célula en el que el ARN se transcribe y se traduce adicionalmente para dar proteínas virales.

5. Gemación a partir de la célula huésped: Las proteínas HA y NA forman agrupaciones cerca de la membrana celular que posteriormente también alojan el ARN viral y las proteínas de núcleo, lo cual conduce después a la "gemación" del virus y la propagación para la infección posterior.

Tal como se observa a partir de las etapas de infección y propagación detalladas anteriormente, HA y NA desempeñan un papel importante en la infección. Antes de la liberación del virión, NA también escinde ácido siálico para prevenir la unión de HA a ácido siálico.

Intervenciones actuales para virus influenza A: Hay dos clases de fármacos aprobados por la FDA de los Estados Unidos contra el virus influenza A: inhibidores del canal de iones tales como adamantanos (clorhidrato de amantadina y rimantadina); e inhibidores de neuraminidasa tales como oseltamivir (TAMIFLU) y zanamivir (RELENZA).

El virus influenza A es propenso a mutaciones. Estas mutaciones son principalmente de proteínas virales tales como NA, HA y proteínas del canal de iones M2, y por tanto los inhibidores de estas proteínas serán ineficaces frente a cepas mutantes. El potencial de mutación y la pandemia mundial de gripe A de 2009 presentan una necesidad urgente de terapias que ofrezcan un tratamiento y opciones de prevención frente a este virus.

Técnica anterior

Richard Anderson *et al*, "Isolation and characterization of polyphenols Type A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity" en el Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, págs. 52, 65-70.

Este artículo describe un extracto acuoso de canela comercial y ha identificado polímeros polifenólicos que aumentan el metabolismo de la glucosa aproximadamente 20 veces en líneas celulares *in vitro*. Usaron *Cinnamomum cassia* (*Korintji cassia*) para la preparación de este extracto. Esta variedad tiene un alto contenido en cumarina y cinamaldehído.

Este artículo describe además un método de HPLC preparativa para la preparación y caracterización de este extracto acuoso.

Esta publicación describe procianidina de catequinas de unión doble de tipo A. Este artículo ha identificado el trímero (peso molecular de 864), tetrámero (peso molecular de 1152) y oligómero de catequinas que se aíslan de la canela.

Kilkuskie et al, "HIV and reverse transcriptase inhibition by tannins" en Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 1992, vol. 2, págs. *1529 - 1534.*

Esta publicación evalúa taninos y taninos condensados para determinar su actividad anti-VIH y su potencial para inhibir la enzima transcriptasa inversa. Aunque este estudio descubrió algunos taninos con actividad anti-VIH, presentaban toxicidades asociadas. Esta publicación trata sobre 3 compuestos que son formas condensadas de catequinas. Las moléculas 40, 44 y 45 son dímeros, trímeros y tetrámeros de catequinas. Este artículo concluyó que

no había ninguna correlación entre la inhibición de la enzima RT y la acción anti-VIH de estos taninos. Adicionalmente, las moléculas 44 y 45 mostraron una actividad anti-VIH del 90% y el 73% respectivamente, pero no mostraron inhibición significativa de la enzima RT.

Michael Ovadia *et al.* en la solicitud de patente US 2006 275515A1.

Esta patente titulada "Anti-viral preparations obtained from a natural cinnamon extract" describió un extracto acuoso natural obtenido a partir de canela que tiene propiedades antivirales. Este documento describe un extracto acuoso de canela que se somete a precipitación con una sal. Este precipitado vuelve a disolverse en agua o tampón y se purifica usando cromatografía con Sepharose y posteriormente se eluye con otro tampón y galactosa.

El procedimiento comúnmente usado para precipitación con sales se refiere a la selección de moléculas de alto peso molecular (habitualmente péptidos). Por tanto, resulta bastante evidente a partir de este procedimiento que el procedimiento descrito en este documento tiene como objetivo recuperar moléculas de alto peso molecular (aproximadamente 10 KDa).

El principio activo de la composición según la reivindicación tiene un peso molecular superior a 10 KDa y responde a una absorbancia a 280 nm a una D.O. de entre aproximadamente 15 y 20. Finalmente se eluye este compuesto de la columna de Sepharose usando tampón fosfato y galactosa. Por tanto, el compuesto final tendrá altas concentraciones de fosfatos y galactosa.

Este compuesto de alto peso molecular descrito en esta solicitud se ha sometido a prueba con virus influenza A PR 8, virus parainfluenza (Sendai), preabsorción en eritrocitos y aumento de peso en ratones infectados por influenza o el virus Sendai y un estudio de sincitios de VIH.

El ejemplo 13 de esta solicitud de patente describe una prueba realizada con este extracto en células MT2 para comprobar el efecto sobre la formación de sincitios. Según la figura 15 de esta solicitud, a concentraciones de 60 a 100 microgramos, inhibe la formación de sincitios. La formación de sincitios no es una prueba confirmatoria de actividad antiviral. Esto se esclarece con evidencias en la siguiente publicación. [Gueseppe pantaleo *et al* Eur J immunology 1991, 21, 1771:1774 "dissociation between syncytia formation and HIV spreading. Suppressing Syncytia formation does not necessarily reflect inhibition of HIV infection"].

Aunque el extracto dado a conocer mostró potencial para inhibir la formación de sincitios, debe observarse que sólo algunas cepas de VIH provocan formación de sincitios. Adicionalmente, la formación de sincitios no puede vincularse a la presencia o a la progresión de infección por VIH o SIDA. La formación de sincitios es simplemente un fenotipo que puede expresarse por algunas cepas. La falta de formación de sincitios no puede asociarse con la ausencia de VIH o el manejo de la infección.

Objetivos de la divulgación

El primer objetivo de la divulgación es proporcionar una composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica de tipo A, trímero y tetrámero a partir de fuente vegetal.

El segundo objetivo de la divulgación es proporcionar un procedimiento para preparar una composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica de tipo A, trímero y tetrámero a partir de fuentes vegetales tales como *Cinnamomum, Litchi* y *Arachis.*

El tercer objetivo de la divulgación es proporcionar una composición que mejora la respuesta inmunitaria en sujetos y que también es eficaz contra la infección por VIH, SIDA y virus influenza e infección.

Descripción de la divulgación

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica de tipo A a una concentración que oscila entre aproximadamente el 55% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 35% p/p, opcionalmente junto con excipientes farmacéuticamente aceptables; a un procedimiento para la preparación de una composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica de tipo A a una concentración que oscila entre aproximadamente el 55% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 35% p/p, comprendiendo dicho procedimiento etapas de realizar la extracción de una masa vegetal pulverizada usando disolvente orgánico para eliminar sustancias tóxicas; secar la masa para eliminar el disolvente orgánico; realizar una nueva extracción de la masa secada usando disolvente acuoso para obtener un extracto; y purificar el extracto mediante columna cromatográfica seguido por concentración, purificación, normalización y secado para obtener la composición; una cantidad farmacéuticamente eficaz de la composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica de tipo A a una concentración que oscila entre aproximadamente el 55% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 35% p/p para su uso en la mejora de las respuestas inmunológicas en un sujeto que lo necesita, en la que dicha cantidad farmacéuticamente eficaz va a administrarse, opcionalmente junto con excipientes

farmacéuticamente aceptables, al sujeto tal como se caracteriza por las reivindicaciones adjuntas; y una cantidad farmacéuticamente eficaz de la composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica de tipo A a una concentración que oscila entre aproximadamente el 55% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 35% p/p para su uso en el tratamiento, la prevención y el manejo de infecciones retrovirales en un sujeto que lo necesita, en la que dicha cantidad farmacéuticamente eficaz va a administrarse, opcionalmente junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, al sujeto tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos adjuntos

La figura 1 muestra la estructura molecular de pentámero de flavonoide.

La figura 2 muestra la EI-EM de pentámero pentamérico de flavonoide.

La figura 3 muestra la ^{13}C-RMN de pentámero de flavonoide.

La figura 4 muestra la cromatografía ultrarrápida de la composición para identificar el pentámero de flavonoide.

La figura 5 muestra la HPLC de pentámero de flavonoide.

Descripción detallada de la divulgación

La presente divulgación se refiere a una composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica de tipo A a una concentración que oscila entre aproximadamente el 55% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 35% p/p, opcionalmente junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una realización de la presente divulgación, la composición se obtiene a partir de una fuente vegetal seleccionada de un grupo que comprende *Cinnamomum, Litchi* y *Arachis.*

En otra realización de la presente divulgación la concentración preferible de flavonoide de procianidina pentamérica oscila entre aproximadamente el 80% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 20% p/p.

En otra realización de la presente divulgación dicho flavonoide de procianidina pentamérica tiene un peso molecular de aproximadamente 1440.

En otra realización de la presente divulgación dichos excipientes se seleccionan de un grupo que comprende gomas, agentes granulantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes disgregantes, agentes edulcorantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes de recubrimiento, plastificantes, conservantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, agentes antiestáticos y agentes de esferoidización.

En otra realización de la presente divulgación dicha composición se formula en diversas formas de dosificación seleccionadas de un grupo que comprende comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos o polvos dispersables, emulsión en cápsulas de gel duro o blando, jarabes y elixires.

La presente divulgación se refiere a un procedimiento para la preparación de una composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica de tipo A a una concentración que oscila entre aproximadamente el 55% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 35% p/p, comprendiendo dicho procedimiento etapas de realizar la extracción de la masa vegetal pulverizada usando disolvente orgánico para eliminar sustancias tóxicas; secar la masa para eliminar el disolvente orgánico; realizar una nueva extracción de la masa secada usando disolvente acuoso para obtener un extracto; y purificar el extracto mediante columna cromatográfica seguido por concentración, purificación, normalización y secado para obtener la composición.

En una realización de la presente divulgación la masa vegetal pulverizada se selecciona de un grupo de plantas que comprende *Cinnamomum, Litchi* y *Arachis.*

En otra realización de la presente divulgación el disolvente orgánico se selecciona de un grupo que comprende acetato de etilo, acetato de butilo, acetato de amilo, acetato de 2-etilhexilo y cualquier combinación de los mismos.

En otra realización de la presente divulgación dicha extracción se lleva a cabo durante un periodo de tiempo que oscila entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 12 horas, preferiblemente durante aproximadamente 10 horas.

En otra realización de la presente divulgación dichas sustancias tóxicas incluyen cumarina y aldehídos.

En otra realización de la presente divulgación dicho extracto se filtra a través de una columna cromatográfica de dos etapas.

En otra realización de la presente divulgación dichas columnas cromatográficas se seleccionan de un grupo que comprende resinas XAD-1180, XAD-7HP y XAD-1140.

En otra realización de la presente divulgación dicha nueva extracción con disolvente acuoso se lleva a cabo a un pH que oscila entre aproximadamente 3,8 y aproximadamente 5,8, preferiblemente a aproximadamente 4,0.

En otra realización de la presente divulgación dicha nueva extracción se lleva a cabo durante un periodo de tiempo que oscila entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 12 horas, preferiblemente durante aproximadamente 10 horas a una temperatura que oscila entre aproximadamente 30ºC y 90ºC, preferiblemente que oscila entre 31ºC y 40ºC.

En otra realización de la presente divulgación dicho disolvente acuoso es agua desionizada acidificada.

En otra realización de la presente divulgación dicha composición comprende además excipientes seleccionados de un grupo que comprende gomas, agentes granulantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes disgregantes, agentes edulcorantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes de recubrimiento, plastificantes, conservantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, agentes antiestáticos y agentes de esferoidización.

La presente divulgación se refiere a una cantidad farmacéuticamente eficaz de composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica de tipo A a una concentración que oscila entre aproximadamente el 55% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 35% p/p, para su uso en la mejora de las respuestas inmunológicas en un sujeto que lo necesita, en la que dicha cantidad farmacéuticamente eficaz va a administrarse, opcionalmente junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, al sujeto tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas.

Según la presente invención la respuesta inmunológica se mejora en enfermedades seleccionadas de un grupo de, pero no limitadas a, gripe, infección por VIH y SIDA.

En otra realización de la presente divulgación la respuesta inmunológica se mejora en un sujeto que lo necesita.

En otra realización de la presente divulgación la cantidad farmacéuticamente eficaz de composición oscila entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto.

En otra realización de la presente divulgación dicha cantidad farmacéuticamente eficaz para su uso en la mejora de las respuestas inmunológicas es para su uso en el tratamiento, la prevención y el manejo de infección provocada por un patógeno en el sujeto tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas.

En otra realización de la presente divulgación dicho patógeno incluye virus influenza A y virus VIH.

En otra realización de la presente divulgación dichos tipos de virus son virus H1N1, H3N2, X4 y R5 trópicos.

En otra realización de la presente divulgación el sujeto es un animal o ser humano.

La presente divulgación se refiere a una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica de tipo A a una concentración que oscila entre aproximadamente el 55% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 35% p/p para su uso en el tratamiento, la prevención o el manejo de infecciones virales en un sujeto que lo necesita, en la que dicha cantidad farmacéuticamente eficaz va a administrarse, opcionalmente junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, como preparación antiviral al sujeto, tal como se caracteriza por las presentes reivindicaciones.

En otra realización de la presente divulgación dicha composición inhibe virus influenza A, virus X4 trópico y R5 trópico de VIH.

En otra realización de la presente divulgación la cantidad farmacéuticamente eficaz de composición oscila entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto.

En otra realización de la presente divulgación el sujeto es un animal o ser humano.

La presente divulgación se refiere a una cantidad farmacéuticamente eficaz de composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica de tipo A a una concentración que oscila entre aproximadamente el 55% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 35% p/p para su uso en el tratamiento, la prevención y el manejo de infecciones retrovirales en un sujeto que lo necesita, en la que dicha cantidad farmacéuticamente eficaz va a administrarse, opcionalmente junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, al sujeto.

En una realización de la presente divulgación dichas infecciones retrovirales incluyen infección por influenza A e

infección por VIH y SIDA.

En otra realización de la presente divulgación la cantidad farmacéuticamente eficaz de composición oscila entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto.

En otra realización de la presente divulgación el sujeto es un animal o ser humano.

La presente divulgación se refiere a una composición normalizada novedosa derivada a partir de fuentes botánicas, normalizada a del 50% al 99% de un pentámero de procianidina de tipo A de un flavanoide tal como se muestra en la figura 1. La presente divulgación también se refiere a un método de obtención de una composición normalizada novedosa derivada a partir de fuentes botánicas, normalizada a del 50% al 99% de un pentámero de procianidina de tipo A de un flavonoide. La presente divulgación también se refiere a una composición normalizada novedosa derivada a partir de fuentes botánicas, normalizada a del 50% al 99% de un pentámero de procianidina de tipo A de un flavanoide para su uso en la prevención, el tratamiento y el manejo de infección por VIH y por influenza.

La presente divulgación también se refiere a una composición normalizada novedosa derivada a partir de fuentes botánicas, normalizada a del 50% al 99% de un pentámero de procianidina de tipo A de un flavanoide para su uso en provocar una respuesta inmunológica mejorada frente a un antígeno en un sujeto que lo necesita tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas.

En otra realización de la presente divulgación, la respuesta inmunológica puede ser de naturaleza de tratamiento, manejo o profiláctica.

En una realización de la presente divulgación las fuentes botánicas usadas para obtener la composición son *Cinnamomum, Litchi* y *Arachis.*

En una realización de la presente divulgación, la composición normalizada novedosa derivada a partir de fuentes botánicas se normaliza con respecto a un pentámero de procianidina de tipo A de flavanoide.

En otra realización de la presente divulgación, el pentámero tiene un peso molecular de 1440 tal como se muestra en la figura 1.

En otra realización de la presente divulgación, la composición comprende un pentámero que oscila entre el 50% y el 99%.

En otra realización de la presente divulgación, la composición comprende trímero y tetrámero que oscilan entre el 1% y el 35%.

En otra realización de la presente divulgación, la composición es tal como se caracteriza por el cromatograma de la figura 5.

En otra realización de la presente divulgación, la unidad monomérica de la composición novedosa se elige de un grupo de catequinas, preferiblemente catequina o epicatequina.

La presente divulgación también se refiere a un método de fabricación de la composición novedosa mediante un procedimiento ilustrado en este documento.

En una realización de la presente divulgación, la composición normalizada comprende opcionalmente junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otra realización de la presente divulgación, los excipientes se seleccionan de un grupo que comprende aditivos, gomas, edulcorantes, recubrimientos, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, agentes de disgregación, agentes de suspensión, disolventes, colorantes, deslizantes, antiadherentes, agentes antiestáticos, tensioactivos, plastificantes, agentes emulsionantes, sabores, potenciadores de la viscosidad y antioxidantes.

En todavía otra realización de la presente divulgación, la composición se formula para dar formas de dosificación tales como líquido, polvo, cápsula, comprimido, producto inyectable, parche, pomada, gel, emulsión, crema, loción, dentífrico, pulverización y gotas. En todavía otra realización de la presente divulgación, la composición es o bien un polvo o bien líquido.

La presente divulgación también se refiere a un procedimiento de obtención de una composición normalizada novedosa derivada a partir de fuentes botánicas, normalizada a del 50% al 99% de un pentámero de procianidina de tipo A de un flavanoide, en el que el procedimiento comprende etapas de:

1. Triturar el material de partida botánico hasta obtener un tamaño predeterminado.

2. Realizar la extracción con un disolvente orgánico para eliminar sustancias tóxicas no deseadas.

3. Realizar la extracción acuosa del polvo botánico con agua desionizada.

4. Purificar el extracto usando una configuración de purificación cromatográfica de dos etapas.

5. Secar, combinar y tamizar para obtener la composición que comprende un pentámero de un flavanoide con una pureza del 50% al 99% tal como se muestra en la figura 1.

La presente divulgación también se refiere al uso de la presente composición novedosa opcionalmente junto con excipientes para fabricar un medicamento para el tratamiento y manejo de VIH y la prevención, el tratamiento y el manejo de infección por virus influenza. La presente divulgación también se refiere al uso de la presente composición opcionalmente junto con excipientes para fabricar un medicamento para tratar y manejar la infección por VIH y prevenir, tratar y manejar la infección por influenza en un sujeto que lo necesita.

La presente divulgación también se refiere al uso de la presente composición opcionalmente junto con excipientes para fabricar un medicamento para respuesta inmunológica mejorada en un sujeto que lo necesita. La presente divulgación también se refiere a la presente composición para su uso en provocar una respuesta inmunológica mejorada en un sujeto que lo necesita, tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas.

En todavía otra realización de la presente divulgación, los sujetos son animales y seres humanos.

La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para fabricar una composición normalizada novedosa derivada a partir de fuentes botánicas, normalizada a del 50% al 99% de un pentámero de procianidina de tipo A de un flavanoide, que comprende las etapas de:

1. Triturar canela botánica o pericarpio de lichi o cáscaras de nueces molidas con recubrimiento de semillas de color rojo.

2. Realizar la extracción del material para eliminar las grasas y toxinas y otros compuestos aromáticos usando un disolvente orgánico (preferiblemente éster) que consiste principalmente en acetato de etilo, acetato de butilo, acetato de amilo o acetato de 2-etilhexilo, o bien como disolvente individual o bien como una mezcla de los disolventes anteriores. Esta etapa es opcional para la canela.

3. Secar el material vegetal sometido a extracción para liberar el disolvente.

4. Realizar la extracción con agua desionizada a pH 4 o a pH de entre 3,8 y 5,8, preferiblemente a pH 4,0. Purificar el extracto usando una separación cromatográfica de dos etapas, una para moléculas polares y una para no polares.

5. Se eluye el material adsorbido usando un disolvente alcohólico.

6. Se concentra el disolvente eluído hasta obtener un polvo fino.

7. Se diluye la masa concentrada con agua y opcionalmente se seca por pulverización para eliminar los disolventes residuales.

La composición novedosa obtenida mediante el procedimiento anterior comprende el 50% - 99% de pentámero, el 1% - 35% de trímero y el 1% - 35% de tetrámero y se caracteriza tal como se muestra en la figura 5.

La divulgación se describe adicionalmente con la ayuda de los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no deben interpretarse como limitativos del alcance de la divulgación.

Ejemplo 1

Se empapan 1000 g de canela en polvo pulverizada con un tamaño promedio que oscila a partir de un tamaño de 16 de malla en 3000 ml de acetato de etilo y se vierten en un extractor que tiene un tamiz de fondo perforado con un tamiz de 200 de malla. Se recircula el eluyente de fondo una y otra vez sobre la masa empaquetada para lograr una extracción eficaz durante un periodo de aproximadamente 8 h. Se descarta el eluyente y se retira la masa del extractor y se seca en un horno de ventilación forzada a 30ºC. Tras eliminar el disolvente mediante secado, volvió a empaquetarse la masa en el extractor. Se extrae la masa empaquetada con 5000 ml de agua desionizada acidificada a pH 4,0 y se recircula el extracto sobre el lecho durante aproximadamente 8 h a 35ºC para lograr una extracción eficaz.

Se filtra el extracto a través de una columna cromatográfica de dos etapas para obtener la composición que tiene el 80% de pentámero de procianidina de tipo A de flavanoide con un peso molecular de 1440, se hace pasar el extracto a través de la primera columna para extraer las moléculas relativamente menos polares de la composición y la segunda etapa de la separación cromatográfica es para las moléculas relativamente más polares de la composición. Las resinas usadas fueron el equivalente de una resina XAD-1180 y una XAD-7HP, respectivamente. Se lavó exhaustivamente la columna con agua D.M. libre de sustancias adherentes y el eluyente es neutro. Se eluye adicionalmente la columna con 175 ml de alcohol isopropílico puro y se concentra el eluyente recogido a vacío por debajo de 40ºC y se diluye con agua y se seca por pulverización en las siguientes condiciones

Secador por pulverización: Flujo de aire a co-corriente

Temperatura de entrada: 140ºC

Temperatura de salida: 60ºC

RPM del atomizador: 14000

El peso final es de 5 g.

Ejemplo 2

Se empapan 1000 g de canela en polvo pulverizada con un tamaño promedio que oscila a partir de un tamaño de 16 de malla en 3000 ml de acetato de etilo y se vierten en un extractor que tiene un tamiz de fondo perforado con un tamiz de 200 de malla. Se recircula el eluyente de fondo una y otra vez sobre la masa empaquetada para lograr una extracción eficaz durante un periodo de 10 h. Se descarta el eluyente y se retira la masa del extractor y se seca en un horno de ventilación forzada a 30ºC. Tras eliminar el disolvente mediante secado, volvió a empaquetarse la masa en el extractor. Se extrae la masa empaquetada con 5 litros de agua desionizada acidificada a pH 4,0, se recircula el extracto sobre el lecho durante aproximadamente 8 h a 35ºC para lograr una extracción eficaz.

Se filtra el extracto a través de una columna cromatográfica de dos etapas para obtener una composición del 75% de pentámero de procianidina de tipo A de flavanoide con un peso molecular de 1440. En primer lugar se hace pasar el extracto a través de la primera columna para extraer las moléculas relativamente menos polares de la composición y la segunda etapa de la separación cromatográfica es para las moléculas relativamente más polares de la composición. Las resinas usadas fueron el equivalente de una resina XAD-1180 y una XAD-7HP, respectivamente. Se lavó exhaustivamente la columna con agua D.M. libre de sustancias adherentes y el eluyente es neutro. Se eluye adicionalmente la columna con 250 ml de alcohol metílico puro y se concentra el eluyente recogido a vacío por debajo de 40ºC y se diluye con agua y se seca por pulverización en las siguientes condiciones

Secador por pulverización: Flujo de aire a co-corriente

Temperatura de entrada: 145ºC

Temperatura de salida: 60ºC

RPM del atomizador: 14000

El peso final es de 4,5 g.

Ejemplo 3

Se empapan 1000 g de canela en polvo pulverizada con un tamaño promedio que oscila a partir de un tamaño de 16 de malla en 2500 ml de acetato de butilo y se vierten en un extractor que tiene un tamiz de fondo perforado con un tamiz de 200 de malla. Se recircula el eluyente de fondo una y otra vez sobre la masa empaquetada para lograr una extracción eficaz durante un periodo de 10 h. Se descarta el eluyente y se retira la masa del extractor y se seca en un horno de ventilación forzada a 30ºC. Tras eliminar el disolvente mediante evaporación, volvió a empaquetarse la masa en el extractor. Se extrae la masa empaquetada con agua desmineralizada acidificada, se recircula el extracto sobre el lecho durante aproximadamente 12 h a 30ºC para lograr una extracción eficaz.

Se filtra el extracto a través de una columna cromatográfica de dos etapas para obtener la composición del 89% de pentámero de procianidina de tipo A de flavanoide que tiene un peso molecular de 1440. En primer lugar se hace pasar el extracto a través de la primera columna para extraer las moléculas relativamente menos polares de la composición y la segunda etapa de la separación cromatográfica es para las moléculas relativamente más polares de la composición. Las resinas usadas fueron el equivalente de una resina XAD-1180 y una XAD-7HP, respectivamente. Se lavó exhaustivamente la columna con agua D.M. libre de sustancias adherentes y el eluyente es neutro. Se eluye adicionalmente la columna con 200 ml de alcohol etílico puro y se concentra el eluyente recogido a vacío por debajo de 40ºC y se diluye con agua y se seca por pulverización en las siguientes condiciones

Secador por pulverización: Flujo de aire a co-corriente

Temperatura de entrada: 145ºC

Temperatura de salida: 60ºC

RPM del atomizador: 14000

Peso final de 4,8 g.

Ejemplo 4

Se empapan 1000 g de canela en polvo pulverizada con un tamaño promedio que oscila a partir de un tamaño de 16 de malla en 2500 ml de acetato de butilo y se vierten en un extractor que tiene un tamiz de fondo perforado con un

tamiz de 200 de malla. Se recircula el eluyente de fondo una y otra vez sobre la masa empaquetada para lograr una extracción eficaz durante un periodo de 10 h. Se descarta el eluyente y se retira la masa del extractor y se seca en un horno de ventilación forzada a 30ºC. Tras eliminar el disolvente mediante evaporación, volvió a empaquetarse la masa en el extractor. Se extrae la masa empaquetada con 5 litros de agua desionizada acidificada y se recircula el extracto sobre el lecho durante aproximadamente 12 h a 30ºC para lograr una extracción eficaz.

Se filtra el extracto a través de una columna cromatográfica de dos etapas para obtener la composición del 99% de pentámero de procianidina de tipo A de flavanoide que tiene un peso molecular de 1440. En primer lugar se hace pasar el extracto a través de la primera columna para extraer las moléculas relativamente menos polares de la composición y la segunda etapa de la separación cromatográfica es para las moléculas relativamente más polares de la composición. Las resinas usadas fueron el equivalente de una resina XAD-1180 y una XAD-7HP, respectivamente. Se lavó exhaustivamente la columna con agua D.M. libre de sustancias adherentes y el eluyente es neutro. Se eluye adicionalmente la columna con alcohol isopropílico puro y se concentra el eluyente recogido a vacío por debajo de 40ºC y se diluye con agua y se seca por pulverización en las siguientes condiciones

Secador por pulverización: Flujo de aire a co-corriente

Temperatura de entrada: 145ºC

Temperatura de salida: 60ºC

RPM del atomizador: 14000

Peso final de 5 g.

Ejemplo 5

Se empapan 1000 g de canela casia en polvo pulverizada con un tamaño promedio que oscila a partir de un tamaño de 16 de malla en 3000 ml de acetato de etilo y se vierten en un extractor que tiene un tamiz de fondo perforado con un tamiz de 200 de malla. Se recircula el eluyente de fondo una y otra vez sobre la masa empaquetada para lograr una extracción eficaz durante un periodo de aproximadamente 8 h. Se descarta el eluyente y se retira la masa del extractor y se seca en un horno de ventilación forzada a 30ºC. Tras eliminar el disolvente mediante secado, volvió a empaquetarse la masa en el extractor. Se extrae la masa empaquetada con 5000 ml de agua desionizada acidificada a pH 4,0 y se recircula el extracto sobre el lecho durante aproximadamente 8 h a 35ºC para lograr una extracción eficaz.

Se filtra el extracto a través de una columna cromatográfica de dos etapas para obtener la composición que tiene el 55% de pentámero de procianidina de tipo A de flavanoide con un peso molecular de 1440. Se hace pasar el extracto a través de la primera columna para extraer las moléculas relativamente menos polares de la composición y la segunda etapa de la separación cromatográfica es para las moléculas relativamente más polares de la composición. Las resinas usadas fueron el equivalente de una resina XAD-1180 y una XAD-7HP, respectivamente. Se lavó exhaustivamente la columna con agua D.M. libre de sustancias adherentes y el eluyente es neutro. Se eluye adicionalmente la columna con 175 ml de alcohol isopropílico puro y se concentra el eluyente recogido a vacío por debajo de 40ºC y se diluye con agua y se seca por pulverización en las siguientes condiciones

Secador por pulverización: Flujo de aire a co-corriente

Temperatura de entrada: 140ºC

Temperatura de salida: 60ºC

RPM del atomizador: 14000

El peso final es de 2,5 g.

Ejemplo 6: Extracción a partir de pericarpio de lichi secado:

Se empapan 1000 g de pericarpio de lichi secado pulverizado en un volumen de 5000 ml de agua acidulada durante un tiempo de 12 h y se filtran hasta que son transparentes. Se hace pasar el filtrado transparente a través de una columna que contiene resina adsorbente equivalente a XAD-1140 y a XAD-7HP para atrapar los compuestos polares y relativamente no polares. La primera columna, que es la no polar, se eluye con alcohol etílico y se concentra el eluyente para obtener un rendimiento de polvo que fluye libremente de 500 mg. La segunda columna que contiene todas las sustancias polares se eluye con alcohol etílico por separado y se concentra para obtener 1 g de polvo. Con análisis de HPLC, esta fracción mostró el 85% de pentámero de procianidina de tipo A de flavanoide con un peso molecular de 1440.

Ejemplo 7: Extracción a partir de cáscaras de nueces molidas junto con piel roja de las semillas de nueces molidas.

Se empapan 1000 g de cáscaras de nueces molidas secadas junto con la piel roja sobre la semilla en un volumen de

5000 ml de agua acidulada a pH 3,8 durante 48 h y después se filtran para obtener un líquido transparente. Se hace pasar el filtrado transparente a través de una columna que contiene resina adsorbente equivalente a XAD-1140 y XAD-7HP para atrapar los compuestos polares y relativamente no polares. La primera columna, que es la no polar, se eluye con alcohol etílico y se concentra el eluyente para obtener un polvo que fluye libremente con un rendimiento de 20 g. La segunda columna que contiene todas las sustancias polares se eluye con alcohol etílico por separado y se concentra para obtener 500 mg de polvo. Con análisis de HPLC, esta fracción mostró el 82% de pentámero de procianidina de tipo A de flavanoide con un peso molecular de 1440 tal como se muestra en la figura 5.

Ejemplo 8: Purificación para obtener pentámero de flavanoide

Se disuelve el polvo aislado mediante el procedimiento detallado en los ejemplos 1 – 6 en 200 volúmenes de agua y se filtra hasta que es transparente. Se trata el filtrado transparente con carbón activado para decolorar la disolución a 60ºC y se filtra hasta que es transparente sobre papel de filtración para eliminar todas las partículas insolubles. Se extrae dos veces la disolución filtrada así obtenida con acetato de etilo para eliminar todos los compuestos solubles en disolvente y se concentra para obtener un polvo. Se somete el polvo a cromatografía en columna sobre gel de sílice C-18 de fase inversa usando ácido fórmico acuoso al 0,1% y ácido fórmico metanólico al 0,1% de una manera en gradiente en cromatografía ultrarrápida usando los siguientes parámetros.

Equipo: Combiflash Companion con detector de UV variable

Columna: Redisep 12 g (sílice de fase inversa)

Longitudes de onda de detección: 254 nm y 280 nm

Velocidad de flujo: 18 ml/min

Volumen de tubo máximo: 18 ml

Anchura de pico: 1 min

Umbral: 0,20 UA

Disolvente A: ácido fórmico ac. al 0,1%

Disolvente B: ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo

Se descartaron los números de fracciones 1 a 19. Se combinaron los números de fracciones 20 a 22 y se concentraron para obtener 256 g de polvo de color marrón pálido. El polvo resultante, en un sistema de disolventes de examen por CCF con una razón de acetato de sodio 0,1 M:acetonitrilo = 7:3, mostró una mancha de absorción UV a 0,75 Rt al pulverizar con reactivo de anisaldehído/ácido sulfúrico mostró una mancha de color naranja que se piensa que es característica de proantocianidinas.

EI-EM (M-H) (tal como se muestra en la figura 2). Pico iónico a m/z 1439,9 correspondiente a un multicompartimento de constitución de catequinas (múltiplos de 288) correspondiente a un total de cinco unidades. El peso molecular del compuesto aislado es de 1440,9. La configuración de las unidades de catequina concordaba con la de epicatequina, lo cual se confirmó mediante el patrón de acoplamiento. Las dos señales entre δ 4,84 y 4,91, cuatro señales de singlete (ensanchamiento de pico debido al oligómero de alto peso molecular) de estereoquímica 2,3-cis en la unidad de flavan-3-ol. Las señales del anillo F a 4, la posición de los protones de metileno (CH_2) del anillo de la unidad de extremo terminal se observaron entre δ 2,6 y 2,9 m, ensanchamiento de pico observado debido a la naturaleza oligomérica de alto peso molecular. Las señales de la región aromática estuvieron entre δ 6,6 y 7,6, como dos sistemas con respecto a los anillos B y E. Las señales de carbono ^{13}C observadas a δ 100,9 que se confirma que son del carbono C2 y δ 27,9 del carbono C4 del anillo C superior confirman la doble unión con el anillo del sistema central tal como se muestra en la figura 3.

Se obtiene una composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica con una concentración que oscila entre aproximadamente el 55% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 35% p/p, opcionalmente junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, siguiendo los ejemplos 1 a 8 tal como se mencionaron anteriormente. Además, se usó la composición para actividades *in vitro* e *in vivo* mencionadas a continuación en los ejemplos 9 a 14.

Ejemplo 9: Efecto de una composición de prueba sobre el título de anticuerpos humorales en un sujeto tratado con ciclofosfamida (inmunocomprometido).

Se dividieron ratones albinos suizos de cualquier sexo en 5 grupos con seis animales por grupo basándose en el tratamiento que recibieron.

En el día 0, se sensibilizaron los cinco grupos con glóbulos rojos de oveja (SRBC) que contenían 1 x 10^8 células en solución salina normal. Se trataron los grupos 2-5 con fármacos convencionales y combinaciones de composición de

prueba durante 8 días (día 0 a día 7). En el día 7, se extrajeron muestras de sangre de cada ratón en los cinco grupos mediante punción retroorbital para la determinación del título de anticuerpos primarios. Posteriormente, en el día 7, tras la extracción de sangre, se expusieron los ratones a 0,1 ml de SRBC en la almohadilla de la pata. En el día 14, se extrajeron muestras de sangre de cada ratón mediante punción retroorbital para la determinación del título de anticuerpos secundarios.

Los resultados de esta prueba son los siguientes:

GRUPO	TRATAMIENTO	TÍTULO FRENTE A HA PRIMARIOS EN EL DÍA 7	TÍTULO FRENTE A HA SECUNDARIOS EN EL DÍA 14
1	Control	5,33	13,33
2	Ciclofosfamida 25 mg/kg, v.o.	0,33	6,67
3	Ciclofosfamida (25 mg/kg) + composición de prueba (10 mg/kg), v.o.	0,33	13,33
4	Ciclofosfamida (25 mg/kg) + composición de prueba (25 mg/kg), v.o.	12	34,66
5	Ciclofosfamida (25 mg/kg) + composición de prueba (50 mg/kg), v.o.	13,33	40

La inmunidad humoral sirve como primera línea de defensa y protege al huésped frente a la infección. Una inmunidad humoral elevada proporciona una mayor protección frente a patógenos infecciosos. La respuesta de un individuo frente a un antígeno varía y depende de numerosos factores, incluyendo la constitución genética y la historia del individuo. Ciclofosfamida es un fármaco que suprime el sistema inmunitario. Usando este fármaco, todos los animales evaluados en este estudio pueden analizarse basándose en su respuesta frente al antígeno.

Tal como se mostró en la tabla anterior, la composición de prueba reflejó un aumento en los títulos de anticuerpo primarios y secundarios de un sujeto inmunocomprometido. Existe un aumento de múltiples veces en los títulos de anticuerpos primarios y secundarios (inmunidad humoral). Esta respuesta inmunológica se monta en respuesta a la presencia del antígeno, SRBC, y tiene en cuenta la variabilidad de las respuestas inmunológicas debido al tratamiento previo con ciclofosfamida.

Ejemplo 10: Efecto de una composición de prueba sobre macrófago peritoneal, actividad fagocítica de células sanguíneas polinucleares

Montar una respuesta inmunológica frente a un antígeno, aunque es eficaz, requiere una evaluación adicional para determinar la eficacia de este ataque. La eficacia se evalúa mediante la capacidad de la respuesta inmunológica para eliminar el patógeno. Esto se determina evaluando la capacidad fagocítica de la respuesta.

Se dividieron ratones albinos suizos de cualquier sexo en 3 grupos, con seis animales en cada grupo. Se administraron dosis individuales del control y de la composición de prueba a cada uno de los 3 grupos.

Se trató cada grupo durante un periodo de 20 días y en el día 21 recibieron 5 ml de solución salina tamponada con fosfato fría (PBS) por vía intraperitoneal. Posteriormente, se recogió el líquido peritoneal y se contaron los números de macrófagos usando un cuadrado de WBC en un hemocitómetro. El recuento celular se estimó por milímetro cúbico. Se mantuvieron los ratones restantes con tratamiento continuo hasta el día 28, y en el día 29 se extrajo sangre del plexo retroorbital. Se colocaron dos gotas de sangre extraída de cada ratón en un portaobjetos y se dejaron coagular y después se colocaron en una cámara húmeda mantenida a 37ºC durante 25 min. Se incubaron estas células adherentes con suspensión de esporas de *Candida albicans* y se observaron mediante tinción. Posteriormente, se contó el número de células que habían ingerido la suspensión de *Candida*.

Se calcularon el índice fagocítico y el % de fagocitosis usando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice fagocítico} = \frac{\text{N.º total de } \textit{Candida} \text{ en 100 células PMN}}{\text{N.º de células PMN implicadas en la fagocitosis}}$$

% de fagocitosis = N.º de células PMN que han ingerido *Candida* de cada 100 células observadas

Se llevaron a cabo las etapas anteriores y se presentan los resultados en tabla:

GRUPO	TRATAMIENTO	MACRÓFAGOS PERITONEALES	ACTIVIDAD FAGOCÍTICA DE LAS CÉLULAS PMN	
			N.º promedio de *Candida*/PMN	PMN que muestran fagocitosis

1	Control	3558 ± 1361	2,185 ± 0,34	81 ± 3,88
2	Composición de prueba (25 mg/kg)	4300 ± 1241	2,73 ± 0,37	95 ± 2,73
3	Composición de prueba (50 mg/kg)	7758 ± 1512	1,901 0,48	92 ± 2,48

Los resultados anteriores muestran un aumento del recuento de macrófagos peritoneales y la actividad fagocítica. El aumento del número de macrófagos es una indicación directa de una respuesta inmunológica potenciada frente al antígeno. Adicionalmente, la actividad fagocítica aumentada de estos macrófagos es una evidencia de su eficacia frente a un antígeno.

Ejemplo 11: Efecto de una composición de prueba sobre la resistencia de un huésped frente a septicemia abdominal inducida por *E. coli*.

Se dividieron ratones albinos suizos de cualquier sexo en 3 grupos y se trataron con el control y la composición de prueba. Se administraron dosis individuales a los ratones durante 28 días. En el día 29, se les inyectó a los ratones por vía intraperitoneal una suspensión de *E. coli* que contenía 2,5 x 10^9 en PBS. Se observaron los ratones para determinar la mortalidad durante 24 horas tras la inyección. La mortalidad observada se debe a la infección por *E. coli* y también se denomina septicemia. Se observaron adicionalmente los animales que sobrevivieron durante 7 días para determinar la mortalidad.

Los resultados de este experimento se presentan en tabla a continuación:

GRUPO	TRATAMIENTO	MORTALIDAD A LAS 24 HORAS
1	Control	8/8
2	Composición de prueba a 10 mg/kg	8/8
3	Composición de prueba a 50 mg/kg	3/8

Tal como se observa a partir de los resultados anteriores, la mortalidad con el control y la dosis inferior de la composición de prueba fue del 100%. A una dosis de 50 mg/kg de la composición de prueba la mortalidad se redujo en un 63%. Sólo 3 de los 8 ratones murieron en comparación con los 8 que murieron en los otros dos grupos. Además, no se observó ninguna mortalidad adicional en este 3er grupo.

Esto muestra el efecto profiláctico de la composición de prueba para el huésped. El tratamiento previo con la composición de prueba redujo la mortalidad de los ratones expuestos a un patógeno. Esto confirma la capacidad de la composición de prueba para prevenir la infección por patógenos incluyendo bacterias y virus.

Esta prevención de infección se debe a la respuesta inmunológica mejorada provocada por la composición en presencia de un patógeno. Esta respuesta le permite al huésped controlar los números del patógeno, previniendo así la infección.

Ejemplo 12: Inhibición del virus influenza A (H1N1 y H3N2)

Este ejemplo muestra la eficacia de la composición de prueba para inhibir los virus H1N1 y H3N2 y por tanto establece su eficacia como método de tratamiento, prevención y manejo de esta infección viral.

Se inocularon células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) ($3x10^5$ células por pocillo) en placas de 6 pocillos un día antes de la infección por el virus H1N1 y H3N2. Tres días después, se infectaron las células por virus H1N1 y H3N2 diluidos en serie durante 1 hora antes de añadir 3 ml de medio de recubrimiento en cada pocillo. Tras cuarenta horas, se fijaron las células con formalina al 10% durante 1 hora y se tiñeron con cristal violeta al 1% durante 15 minutos. Se determinaron los títulos de virus según las placas de lisis contadas.

Se determinó la sensibilidad de los virus a los compuestos mediante ensayo de reducción de placas de lisis. Los procedimientos fueron similares al ensayo de placas de lisis excepto porque se añadieron cantidades indicadas de compuestos en el medio de recubrimiento. Se calculó el porcentaje de inhibición como [100 - (V_D / V_C)] X 100%, donde V_D y V_C se refieren al título de virus en presencia y ausencia del compuesto, respectivamente. Se calculó la concentración mínima de compuestos requerida para reducir el 50% de los números de palcas de lisis (CE_{50}) mediante análisis de regresión de las curvas de dosis-respuesta generadas a partir de los ensayos de palcas de lisis.

	Cepa sensible (676)	**Cepa resistente (6706)**
Composición de prueba (ug/ml)		
0	78,5	11
25	40	7
50	25,5	3,5
CE_{50}	**25,5 (17,7 nM)**	**36,1 (25 nM)**
Tamiflu (nM)		

CE_{50}	4,5	>5000

Compuesto de prueba (μg/ml)	H3N2	
	UFP	Tasa de inhibición (%)
	141,67	0
	110,33	22,11
	57,33	59,53
	27,67	80,47
CI_{50}	**43,64**	

A partir de la presentación en tablas anterior, queda claro que la composición de prueba, es evidente que las células infectadas tratadas con composición de prueba mostraron una reducción notable en la formación de palcas de lisis. Adicionalmente, se mostró que la composición de prueba era altamente eficaz frente a la cepa resistente a Tamiflu de H1N1, demostrando por tanto su eficacia como posible tratamiento de la infección por virus influenza (H1N1). Además, la 2ª tabla muestra la eficacia de compuestos de prueba para inhibir también la cepa H3N2 del virus influenza A.

Ejemplo 13: Efecto de una composición de prueba sobre CMSP estimuladas con VIH-1 (virus X4 trópico y virus R5 trópico)

Se obtuvo VIH-1 (HXB2-X4 trópico) 48 horas después de transfectar un clon molecular HXB2 en células 293T. Se detectó el título de virus mediante PCR en tiempo real. Entonces se infectó el virus en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) en 24 pocillos. Tras 16-18 horas, se lavaron las CMSP con disolución de tampón fosfato (PBS) y se añadió medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) recién preparado con suero bovino fetal al 2% (FBS). Se recogieron las células y el caldo de virus a los 3, 5 y 7 días post-infección (dpi).

Se sometieron a prueba la composición de prueba y 3 fármacos convencionales (AZT, AMD3100 y Tak-779) en células CMSP estimuladas con fitohemaglutinina (PHA 2 μg/ml) transfectadas con virus VIH-1 HXB2 (virus X4 y virus R5). Se encontró que la multiplicidad de infección (MOI) era de 0,26. Se realizó la detección de la carga viral mediante RT-PCR tal como se describió anteriormente en el día 3, día 5 y día 7 post-infección.

AMD3100 sólo mostró actividad inhibidora frente a virus CXCR4 trópico (CE_{50} promedio = 2,05 nM) mientras que Tak-779 sólo mostró actividad inhibidora frente a virus CCR5 trópico (CE_{50} promedio = 0,56 nM). AZT mostró actividad inhibidora frente a virus tanto CCR5 trópico como CXCR4 trópico. La composición de prueba mostró un valor de CE_{50} de 22,5 μg/ml (15,625 nM) para el virus X4 y de 15,5 μg/ml (10,77 nM) para el virus R5. Estos valores fueron comparables y en algunos casos más eficaces que los fármacos convencionales usados.

Los ejemplos 9 -11 muestran las propiedades de respuesta inmunológica de la composición de prueba mientras que los ejemplos 12- 13 muestran el efecto antiviral de la composición de prueba frente a VIH y al virus influenza (H1N1). En combinación, los ejemplos 9 - 13 muestran que la composición de prueba actúa para prevenir la infección mediante un mecanismo doble: La respuesta inmunológica potenciada puede actuar como opción protectora o profiláctica para prevenir completamente la infección. En segundo lugar, en caso de infección, las propiedades antivirales de la composición de prueba reducen la carga viral (tanto de VIH como de influenza) permitiendo así que la respuesta inmunológica potenciada resuelva la infección y prevenga un daño adicional. Es importante observar que esta respuesta inmunológica sólo se provoca en presencia de un antígeno. Esto se confirma por el hecho de que ninguno de los animales mostró signos de inflamación y/o otros síntomas asociados con un sistema inmunitario sobreactivado.

Esta propiedad de la composición de prueba hace que sea muy adecuada para su uso a largo plazo como agente profiláctico para prevenir la infección.

La composición de la presente divulgación mejora la respuesta inmunológica no sólo a amplios intervalos de concentración de composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica con una concentración que oscila entre aproximadamente el 55% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 35% p/p. La eficacia de la composición para provocar una respuesta inmunológica es mejor / extraordinaria en intervalos de concentración específicos de composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica que oscila entre aproximadamente el 80% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 20% p/p.

Ejemplo 14: Estudio de prueba de concepto para mostrar la eficacia y seguridad de la composición novedosa en pacientes con VIH y SIDA:

Se realizó un estudio prospectivo, doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo, en 40 pacientes infectados por VIH-1 asintomáticos, que no habían recibido tratamiento antirretroviral. Se estudió la composición de prueba en 40 pacientes infectados por VIH-1 asintomáticos, que no habían recibido tratamiento antirretroviral, cuyo recuento de

CD4 era de entre 250-500/mm^3. Se sometió a prueba la composición de prueba a 300 mg/día durante 12 semanas y se administró en forma de dosificación de cápsulas. La composición de prueba mostró una reducción de la carga viral de un 11,29% en comparación con placebo que mostró un aumento de un 67,28%. Hubo una disminución del recuento de CD4 en ambos grupos, pero se encontró que el porcentaje de reducción del recuento de CD4 en el grupo de composición de prueba era de la mitad del de placebo (el 7,74% en la composición de prueba en comparación con el 13,88% de disminución en placebo). Por tanto, se encontró que la composición de prueba era segura y eficaz con respecto a la mayoría de las funciones de órganos vitales y los parámetros bioquímicos.

El ejemplo 14 detalla la capacidad de la composición de prueba para inhibir la carga viral confirmando así el efecto antiviral de la composición de prueba. Además, la mejora en el recuento de WBC (CD4) en comparación con el placebo es una indicación importante de la mejora de la respuesta inmunológica.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica de tipo A a una concentración que oscila entre aproximadamente el 55% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 35% p/p, opcionalmente junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que la concentración de flavonoide de procianidina pentamérica oscila preferiblemente entre aproximadamente el 80% p/p y aproximadamente el 98% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila preferiblemente entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 20% p/p.

3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que el flavonoide de procianidina pentamérica tiene un peso molecular de aproximadamente 1440.

4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición se formula en diversas formas de dosificación seleccionadas de un grupo que comprende comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos o polvos dispersables, emulsión en cápsulas de gel duro o blando, jarabes y elixires.

5. Procedimiento para la preparación de una composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica de tipo A a una concentración que oscila entre aproximadamente el 55% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 35% p/p, comprendiendo dicho procedimiento etapas de:

a) realizar la extracción de una masa vegetal pulverizada usando disolvente orgánico para eliminar sustancias tóxicas;

b) secar la masa para eliminar el disolvente orgánico;

c) realizar una nueva extracción de la masa secada usando disolvente acuoso para obtener un extracto; y

d) purificar el extracto mediante columna cromatográfica seguido por concentración, purificación, normalización y secado para obtener la composición.

6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición se obtiene a partir de una fuente vegetal seleccionada de un grupo que comprende, o procedimiento según la reivindicación 5, en el que la masa vegetal pulverizada se selecciona de un grupo de plantas que comprende *Cinnamomum, Litchi* y *Arachis*.

7. Procedimiento según la reivindicación 5 ó 6, en el que el disolvente orgánico se selecciona de un grupo que comprende acetato de etilo, acetato de butilo, acetato de amilo, acetato de 2-etilhexilo y cualquier combinación de los mismos; y el disolvente acuoso es agua desionizada acidificada.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la extracción se lleva a cabo durante un periodo de tiempo que oscila entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 12 horas, preferiblemente durante aproximadamente 10 horas.

9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que las sustancias tóxicas se seleccionan de un grupo que comprende cumarina y aldehídos.

10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que la nueva extracción con disolvente acuoso se lleva a cabo a un pH que oscila entre aproximadamente 3,8 y aproximadamente 5,8, preferiblemente a aproximadamente 4,0; y la nueva extracción se lleva a cabo durante un periodo de tiempo que oscila entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 12 horas, preferiblemente durante aproximadamente 10 horas a una temperatura que oscila entre aproximadamente 30ºC y 90ºC, preferiblemente que oscila entre 31ºC y 40ºC.

11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que el extracto se filtra a través de una columna cromatográfica de dos etapas; y las columnas cromatográficas se seleccionan de un grupo que comprende resinas XAD-1180 y XAD-7HP.

12. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó 6, en la que los excipientes se seleccionan de, o procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en el que la composición comprende además excipientes seleccionados de, un grupo que comprende gomas, agentes granulantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes disgregantes, agentes edulcorantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes de recubrimiento, plastificantes, conservantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, agentes antiestáticos y agentes de esferoidización.

13. Cantidad farmacéuticamente eficaz de composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica de tipo A a una concentración que oscila entre aproximadamente el 55% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 35% p/p para su uso en la mejora de la respuesta inmunológica en enfermedades seleccionadas de un grupo que comprende gripe, infección por VIH y SIDA en un sujeto que lo necesita, en la que dicha cantidad farmacéuticamente eficaz de composición va a administrarse opcionalmente junto con excipientes farmacéuticamente aceptables al sujeto.

14. Cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición que comprende flavonoide de procianidina pentamérica de tipo A a una concentración que oscila entre aproximadamente el 55% p/p y aproximadamente el 99% p/p, trímeros y tetrámeros cada uno a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,5% p/p y aproximadamente el 35% p/p para su uso en el tratamiento, la prevención y el manejo enfermedades seleccionadas de un grupo que comprende gripe, infección por VIH y SIDA en un sujeto que lo necesita, en la que dicha cantidad farmacéuticamente eficaz de composición va a administrarse opcionalmente junto con excipientes farmacéuticamente aceptables como preparación antiviral al sujeto.

15. Composiciones según las reivindicaciones 13 y 14, en las que la gripe está provocada por virus influenza A seleccionado de un grupo que consiste en virus H1N1 y H3N2, y la infección por VIH está provocada por virus VIH seleccionado de un grupo que consiste en virus X4 y R5 trópico y en las que la composición inhibe dichos virus.

16. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en la que la cantidad farmacéuticamente eficaz de composición oscila entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto y el sujeto es un animal o ser humano.

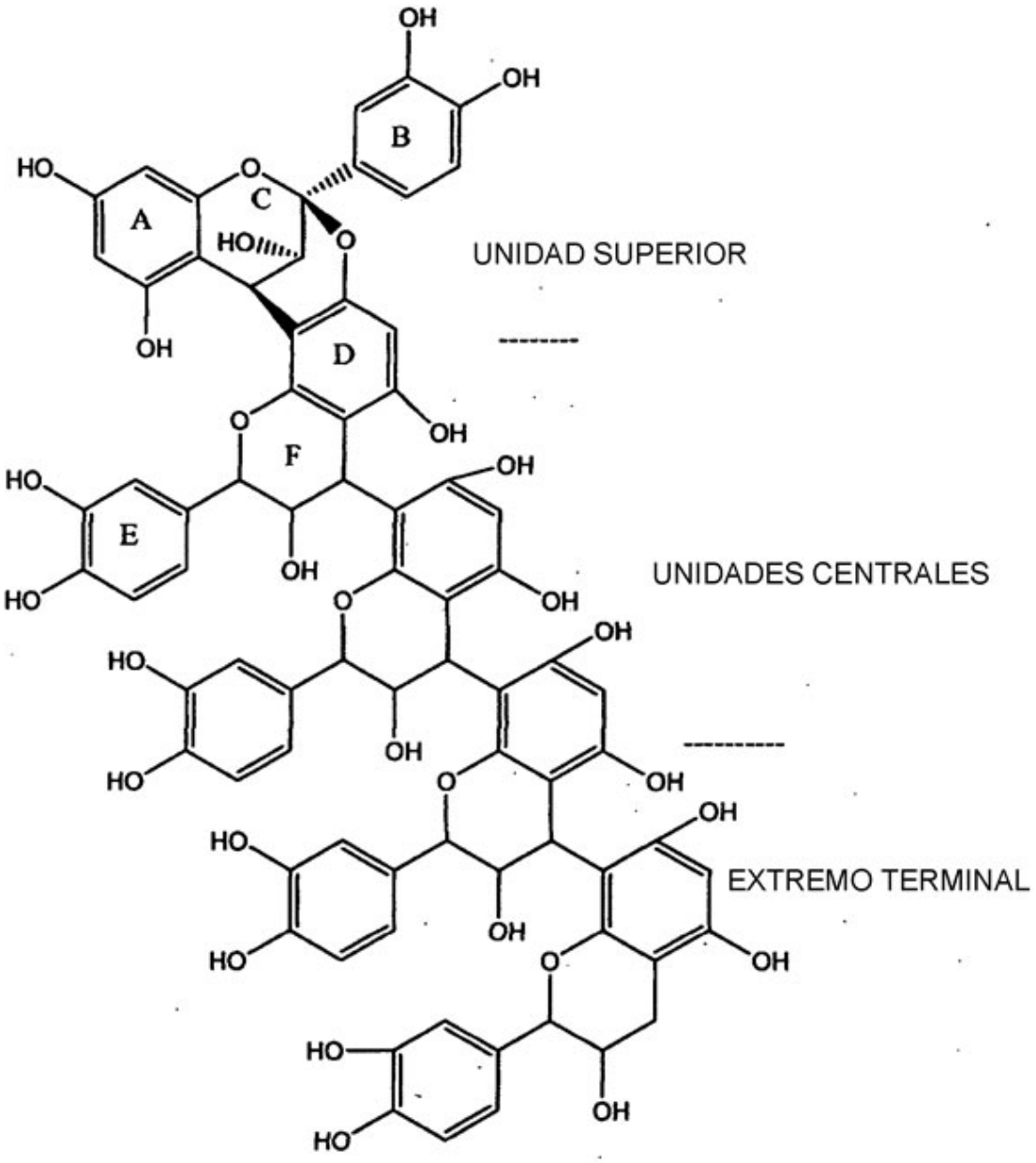

FIGURA 1

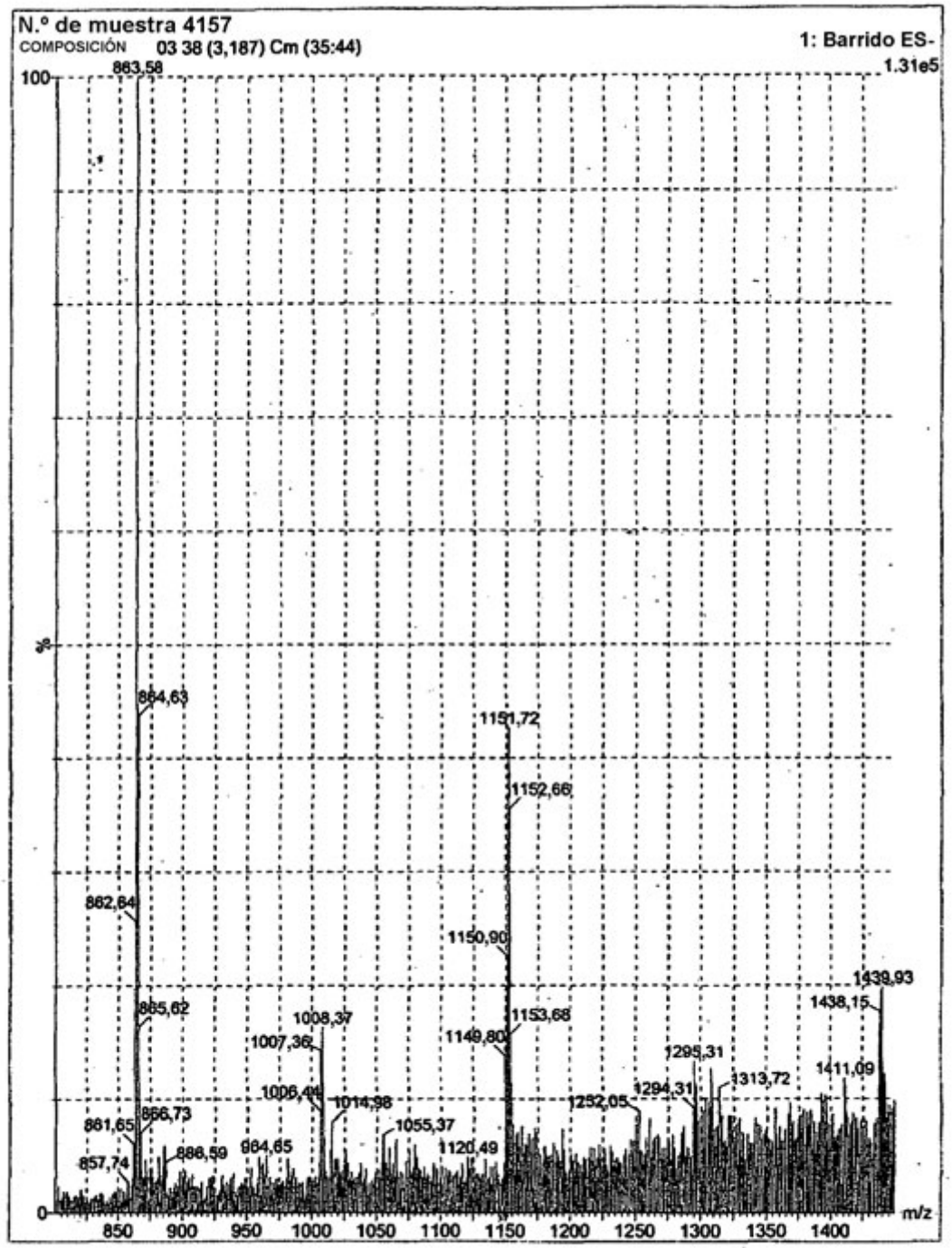
N.º de muestra 4157
COMPOSICIÓN 03 38 (3,187) Cm (35:44)
1: Barrido ES-
1.31e5
100
%
0
863,58
864,63
1151,72
1152,66
862,84
1150,90
1439,93
1438,15
865,62
1008,37
1153,68
1007,36
1149,80
1295,31
1313,72
1411,09
1294,31
1252,05
1006,44
1014,98
866,73
861,65
1055,37
886,59
864,65
1120,49
857,74
850
900
950
1000
1050
1100
1150
1200
1250
1300
1350
1400
m/z

FIGURA 2

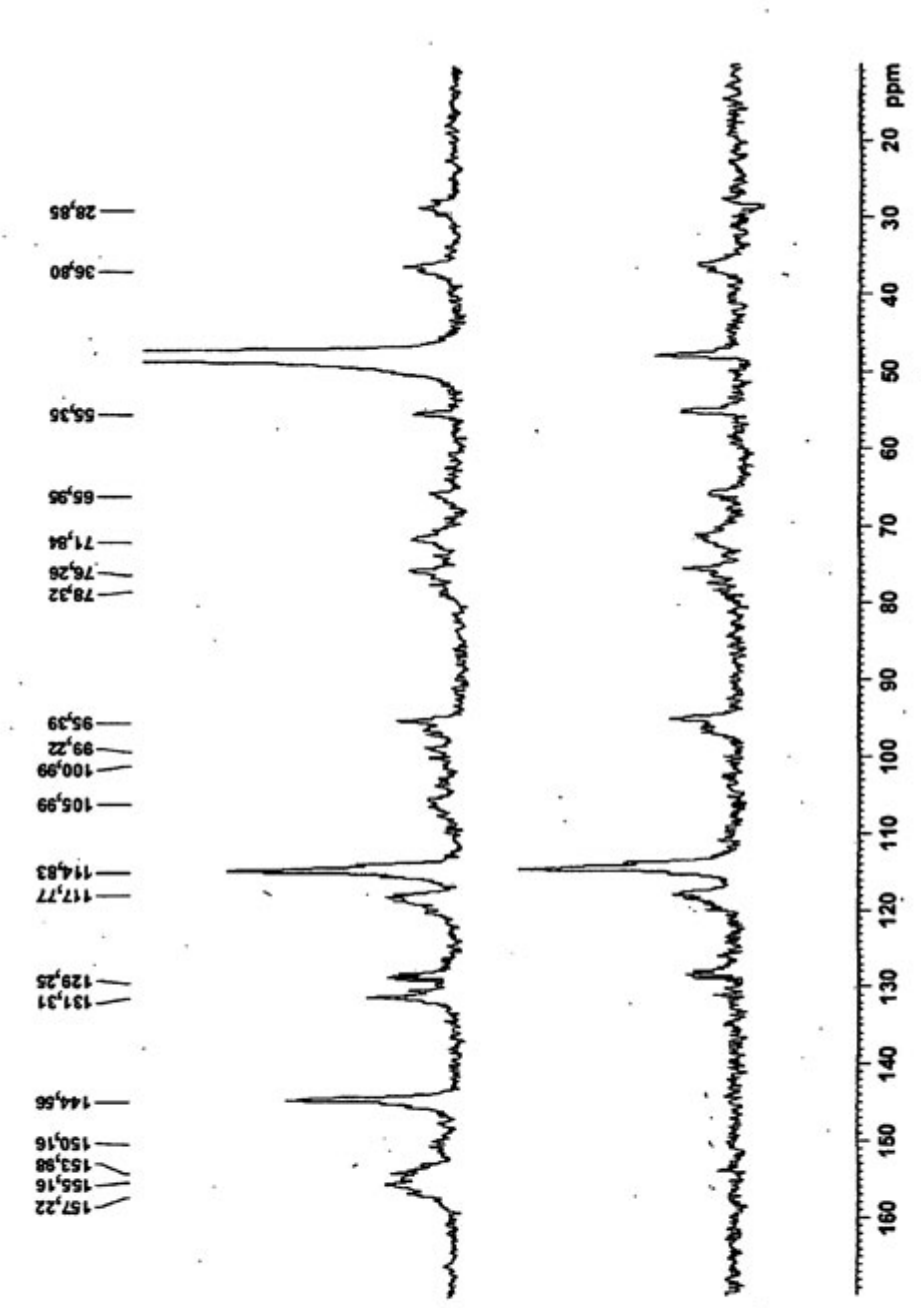
28,85
36,80
55,36
65,96
71,84
76,26
78,32
95,39
99,22
100,99
105,99
114,83
117,77
129,25
131,31
144,56
150,16
153,98
155,16
157,22
ppm
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160

FIGURA 3

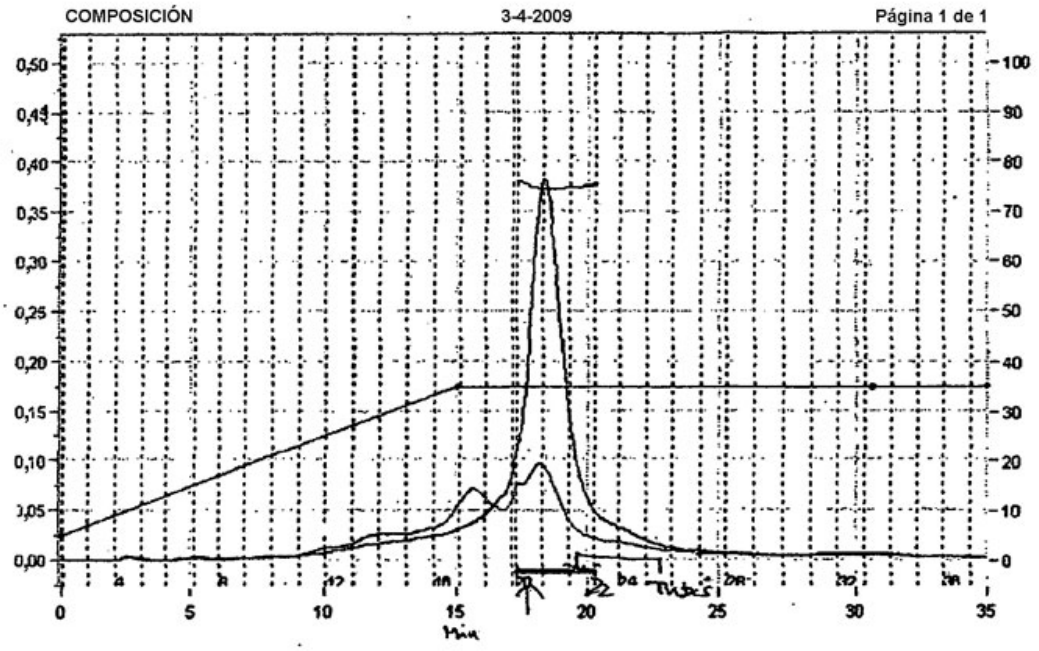
COMPOSICIÓN
3-4-2009
Página 1 de 1
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Min

FIGURA 4

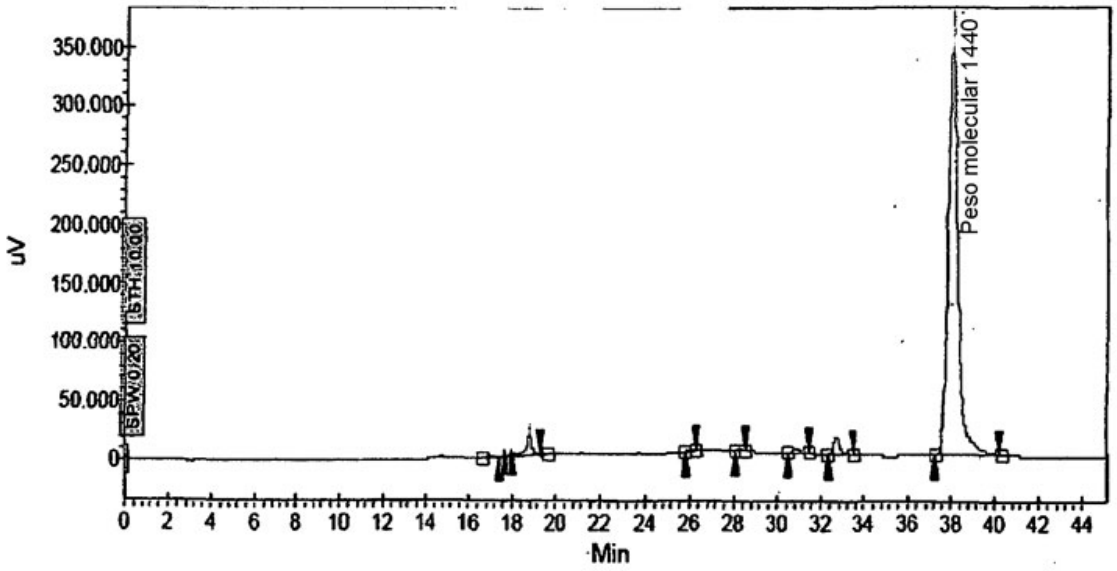
350.000
300.000
250.000
200.000
150.000
100.000
50.000
0
uV
Peso molecular 1440
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44
Min

FIGURA 5