

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 951**

51 Int. Cl.:

A61K 36/28 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2016 PCT/EP2016/055551**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016 WO16156028**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2016 E 16709937 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3277300**

54 Título: **Extracto de Petasites y composición para tratar infecciones víricas**

30 Prioridad:

01.04.2015 EP 15162229

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

15.03.2021

73 Titular/es:

**MAX ZELLER SÖHNE AG (100.0%)
Seeblickstrasse 4
8590 Romanshorn, CH**

72 Inventor/es:

**DREWE, JÜRGEN;
TOFF, STEPHAN y
ZAHNER, CATHERINE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 811 951 T3

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

DESCRIPCIÓN

Extracto de *Petasites* y composición para tratar infecciones víricas

- 5 La presente invención se refiere a un extracto de *Petasites* o composición farmacéutica de la misma para usar en el tratamiento de un mamífero, preferentemente una enfermedad vírica humana.

Antecedentes de la invención

- 10 Las infecciones víricas constituyen enfermedades ampliamente diseminadas producidas por un gran número de diferentes virus. En los animales, en particular, mamíferos, las infecciones víricas conducen normalmente a reacciones de inflamación en sus hospedadores como parte de la respuesta de defensa inmunitaria. Dichas reacciones de inflamación pueden producir incomodidad y, en determinados casos, complicaciones médicas adicionales en el sujeto infectado. Por tanto, es deseable reducir la inflamación producida por infecciones víricas.

- 15 La planta *Petasites* se denomina también comúnmente Petasita y se pueden obtener extractos de *Petasites* de la planta, en particular de las hojas y/o del rizoma. La producción de extractos de *Petasites* es bien conocida en la técnica. Sin embargo, dependiendo del protocolo de extracción, los extractos pueden comprender alcaloides de pirrolizidina que pueden ser hepatotóxicos, carcinogénicos y mutagénicos.

- 20 Se sabe que los extractos de *Petasites* presentan propiedades espasmolíticas y analgésicas. El documento DE-A1 198 38 848 divulga extractos de *Petasites* para usar en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, asma, polinosis, dismenorrea, eczemas, migraña, psoriasis, tensión arterial alta y/o espasmos. El documento EP 1 499 334 B1 describe el uso de un extracto polar de *Petasites* para usar en el tratamiento de dolores. Se describe en la técnica el uso de los extractos de *Petasites* para tratar la rinitis. Para más información sobre la utilidad médica de los extractos de *Petasites* se hace referencia a, por ejemplo, Schapowal *et al.*, 2002, BMJ, 324, 144-6; Thomet *et al.*, 2002, Intern. Immunopharmacol.; Brattström *et al.*, 2003, Phytomedicine, 10, Supl 4, 50- 2; Schapowal *et al.*, 2004, Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., 130, 1381-6; Schapowal *et al.*, 2005, Phytother. Res., 19, 530-7; Keusch *et al.*, 2004, Ars Medici; Käufeler *et al.*, 2006, Adv. Ther., 23, 373-84; Brattström *et al.*, 2010, Phytother. Res., 24, 680-5; Dumitru *et al.*, 2011, J. Allergy Clin. Immunol., 127, 1515-21; y Nebel *et al.*, 2014, Planta Med., 80).

El objetivo subyacente de la presente invención es la provisión de una nueva composición para el tratamiento de infecciones víricas, preferentemente de virus del tracto respiratorio o infecciones víricas de la piel.

- 35 Se ha descubierto de forma sorprendente que un extracto de *Petasites* tiene excelente utilidad para usar en el tratamiento de infecciones víricas en mamíferos.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención se dirige a un extracto de *Petasites* para usar en el tratamiento de una enfermedad vírica en mamífero.

- 40 Generalmente, el término "extracto" como se usa en la técnica y en el presente documento se refiere a cualquier producto de extracción independientemente de la composición química o de la forma física final, por ejemplo, líquida, viscosa, pastosa o sólida. Como es evidente, se entiende que un extracto de planta para uso farmacéutico se refiere a un producto de extracto vegetal que comprende el o los agentes activos de la planta en una forma y cantidad fisiológicamente eficaz. De forma típica, una extracción basada en disolvente, por ejemplo, una extracción en medio acuosa, no acuosa, líquida, gaseosa, con gases críticos, por ejemplo, una extracción con dióxido de carbono subcrítico o supercrítico, dará como resultado componentes extraídos que se separan opcionalmente de las materias primas restantes, por ejemplo, separadas de las materias vegetales sólidas restantes, y cuyos componentes pueden, de forma opcional, procesarse adicionalmente, por ejemplo, purificarse. En el Ejemplo 1 se describe un protocolo ilustrativo preferido y no limitante para la fabricación de un extracto de *Petasites* para usar en la presente invención.

- 50 Dependiendo del tipo y del modo de extracción, un extracto de *Petasites* puede también comprender alcaloides de pirrolizidina y derivados de alcaloides de pirrolizidina tóxicos tales como N-óxidos en una extensión variable. En una realización preferida, el extracto de *Petasites* para usar en la presente invención está libre de alcaloides de pirrolizidina incluyendo cualesquiera derivados de alcaloides de pirrolizidina tales como, por ejemplo, N-óxidos.

Libre de alcaloides de pirrolizidina significa que el extracto de *Petasites* comprende cantidades no tóxicas de alcaloides de pirrolizidina, preferentemente ≤ 2 ppm de alcaloides de pirrolizidina, más preferentemente ≤ 1 ppm de alcaloides de pirrolizidina, lo más preferentemente sin alcaloides de pirrolizidina.

- 60 Generalmente, los extractos de *Petasites* se pueden distinguir en extractos de *Petasites* polares y no polares. En una realización preferida, el extracto para usar en la invención es un extracto de *Petasites* no polar, preferentemente uno producido por extracción con dióxido de carbono líquido, más preferentemente mediante extracción con dióxido de carbono líquido en condiciones de temperatura subcríticas. Las condiciones de temperatura subcríticas en el contexto de la extracción con dióxido de carbono son preferentemente temperaturas de extracción ≤ 31 °C, más preferentemente, temperaturas de extracción entre 0 y 30 °C. Por ejemplo, una extracción de *Petasites* usando un

protocolo de extracción subcrítica con dióxido de carbono para obtener extractos de *Petasites* no polares para usar en la presente invención se describe en la patente europea EP 1 023 079 B1.

5 En una realización preferida alternativa, el extracto para usar en la invención es un extracto de *Petasites* polar, preferentemente un extracto de *Petasites* polar que está libre de alcaloides de pirrolizidina, más preferentemente un extracto de *Petasites* polar que tiene un valor Rf (TLC, gel de sílice 60, eluyente de tolueno/acetato de etilo 93:7) de 0 a 0,21, por ejemplo, como se describe en la patente europea concedida EP 1 499 334 B1. Un ejemplo de un procedimiento para el análisis por TLC de los extractos de *Petasites* se describe en detalle en el Ejemplo 2 más adelante. El principal método de análisis TLC es bien conocido por la persona experta y se describe, por ejemplo, en
10 Hans Rudolf Christen y Fritz Vögtle, "Organische Chemie - von den Grundlagen zur Forschung - Volumen 1, 36-37, 1988.

La capacidad de un extracto de *Petasites* ilustrativo para reducir la inflamación mediada por virus se demuestra en los Ejemplos 3 y 4 siguientes, donde el ácido poliinosínico:policitidílico (Poly IC) y también Poly IC LyoVec™ (Invivo-Gen, Francia) se usan en células epiteliales nasales humanas *ex vivo* como inmunoestimulantes para simular infecciones víricas (Fortier *et al.*, 2004, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 287, 759-66). Este modelo es generalmente aceptado en la técnica como representativo de una infección vírica en mamíferos, en particular, seres humanos. Como lectura para la inflamación, los niveles de expresión de las citoquinas del factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP-1 α y MIP-1 β), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 1 α (IL-1 α), factor α de necrosis tumoral (TNF- α) y el ligando 5 de la quimioquina (motivo C-C) (CCL5) se usaron con y sin la coadministración del extracto de *Petasites* polar "Tesalin" (Max Zeller Soehne AG, Romanshorn, Schweiz).
15

Sorprendentemente, la eficacia del extracto de *Petasites* no polar "Ze 339" ("Tesalin", Max Zeller Söhne AG) era específica para inflamaciones mediadas por virus. Cuando se llevaron a cabo los anteriores experimentos usando estimulantes inflamatorios bacterianos tales como el análogo de lipoproteína bacteriana Pam(3)CSK(4), flagelina u el oligonucleótido CpG bacteriano, no se observó disminución en la expresión de las citoquinas tras la coadministración del extracto de *Petasites* polar "Ze 339" (véase el Ejemplo 5).
25

El extracto de *Petasites* para usar en la presente invención no está limitado a cualquier especie de *Petasites* específica ya que sustancialmente todas las plantas de *Petasites* comprenden cualitativamente los mismos principios fisiológicamente activos. Por tanto, y en una realización preferida adicional, la invención se dirige al uso de extractos de *Petasites* obtenidos de plantas y/o partes de plantas seleccionadas entre el grupo que consiste en *Petasites hybridus*, *Petasites albus*, *Petasites amplus*, *Petasites fragrans*, *Petasites formosanus*, *Petasites frigidus*, *Petasites georgicus*, *Petasites japonicus*, *Petasites laevigatus*, *Petasites kalbikianus*, *Petasites niveus*, *Petasites paradoxus*,
30 *Petasites pyrenaicus*, *Petasites tricholobus*, *Petasites radiates*, *Petasites sagittatus* y *Petasites spurius*.
35

Se prefiere además que los extractos de *Petasites* para usar en la presente invención se usen en el tratamiento de una enfermedad respiratoria vírica o una enfermedad cutánea vírica.

40 La enfermedad respiratoria vírica que se va a tratar se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en la reagudización de enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias producidas por virus, sinusitis crónica producida por virus, pólipos en los senos nasales producidos por virus, infecciones rinovíricas, infecciones por gripe y paragripales, infecciones por virus sincitial respiratorio (VSR), infecciones por adenovirus, infecciones de la familia del virus del herpes, preferentemente herpes simple y herpes zóster, infecciones por rotavirus, enterovirus, preferentemente virus coxsackie, infecciones por el virus del papiloma humano (VPH). Más preferentemente, la enfermedad respiratoria vírica que se va a tratar se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedades del tracto aerodigestivo superior y sinusal, incluyendo otitis media con y sin supuración, rinitis, rinosinusitis, gingivostomatitis, aftosis, faringitis, amigdalitis, faringoamigdalitis, laringitis, traqueítis, bronquitis, bronconeumonía, neumonía, gripe, rinitis y resfriado común.
45
50

La enfermedad cutánea vírica que se va a tratar de acuerdo con la invención se selecciona preferentemente del grupo que consiste en infecciones de tipo 1 y 2 de la familia del virus del herpes, lesiones por herpes zóster, preferentemente, infecciones por herpes en el contexto de eccema atópico, molusco contagioso y lesiones asociadas con el virus del papiloma humano (VPH), más preferentemente condilomas y verrugas producidas por el VPH incluyendo serotipos de riesgo alto y bajo.
55

La presente invención es adecuada para tratar todas las respuestas inflamatorias inducidas por virus y hasta ahora se ha validado experimentalmente para las rutas inflamatorias relacionadas con el receptor asociadas con la familia de receptores de tipo toll (TLR) y la familia de receptores análogos al gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I). En otra realización preferida, la enfermedad vírica que se va a tratar de acuerdo con la invención es preferentemente una enfermedad vírica que da como resultado una inflamación que implica un receptor seleccionado entre el grupo que consiste en la familia de receptores de tipo toll (TLR) y la familia de receptores análogos al gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I), más preferentemente el receptor 3 de tipo toll (TLR3), RIG-I y la proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma (MDA5). Más preferentemente, la enfermedad vírica es una enfermedad de un virus de ARN.
60
65

El extracto para usar en la presente invención puede constituir o formularse en una composición farmacéutica. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se dirige también a una composición farmacéutica para tratar infecciones víricas que comprende un extracto de *Petasites*, y opcionalmente, un excipiente fisiológicamente aceptable.

5 Un extracto o una composición farmacéutica, es decir, un medicamento para usar de acuerdo con la invención comprende normalmente un extracto de *Petasites* en una cantidad farmacéuticamente eficaz adecuada para la administración, formulada opcionalmente junto con aditivos, transportadores, adyuvantes y excipientes farmacéuticamente aceptables y/o agentes farmacéuticamente activos adicionales. Dichos transportadores, adyuvantes y excipientes incluyen, por ejemplo, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, sustancias tamponantes, agua, sales, electrolitos y sustancias basadas en celulosa. Además, se puede usar maltodextrina o sílice para producir un extracto seco de flujo libre que es particularmente adecuado para el procesamiento adicional. Se contemplan también formas farmacéuticas de liberación controlada con o sin porciones de liberación inmediata. Se conocen los métodos para preparar dichas formas farmacéuticas (véase, por ejemplo, H. C. Ansel y N. G. Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5ª ed., Lea y Febiger (1990)).

10 Los niveles y requisitos de dosificación están bien reconocidos en la técnica y las personas normalmente expertas en la técnica pueden seleccionarlos a partir de métodos y técnicas disponibles adecuados para un paciente concreto. Un experto en el campo de la preparación de formulaciones puede seleccionar fácilmente la forma y el modo de administración adecuados para usar un extracto de *Petasites* en la presente invención dependiendo de las características concretas del extracto del producto seleccionado, la enfermedad vírica o la dolencia relacionada con el virus que se va a tratar, la etapa de la enfermedad o dolencia, el paciente específico y otras circunstancias relevantes (véase, por ejemplo, Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (1990)).

Como apreciará la persona experta en la técnica, se pueden requerir dosis inferiores o superiores dependiendo de factores concretos. Por ejemplo, las dosis y los regímenes de tratamiento específicos dependerán de factores tales como el perfil de salud general del paciente, la gravedad y el curso del trastorno del paciente o la disposición del mismo, y el criterio del médico a cargo del tratamiento que incluye potenciales interacciones con otra medicación necesaria.

En una realización preferida, la composición farmacéutica para usar en la presente invención comprende de 5 a 600 mg de extracto de *Petasites*, preferentemente de 10 a 500 mg, más preferentemente de 200 a 300 mg, dependiendo por supuesto de la intensidad requerida del tratamiento.

Aunque puede ser suficiente una dosis por día, se pueden aplicar hasta 5 o más dosis al día, por ejemplo, por vía oral o intranasal. Más preferentemente, se pueden administrar hasta 3 dosis al día. Como apreciará la persona experta en la técnica, se pueden requerir dosis inferiores o superiores dependiendo de factores concretos.

Además de agentes farmacéuticamente aceptables, el extracto o composición para usar de acuerdo con la invención puede comprender también agentes fisiológicamente activos adicionales. De este modo, y en una realización preferida adicional, la composición farmacéutica para usar en la invención puede comprender adicionalmente al menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en

- antiflogísticos, analgésicos, agentes reductores de la fiebre;
- extractos de *chamomilla recutita*, *rizoma de curcumae longae*, *rizoma de curcumae canthorrhizae*, *curcumae canthorrhiza*, *cortex salicis*, *salicis purpurea*, *salicis daphenoides*, *tanacetum parthenium*;
- 45 - elementos traza, preferentemente sales de hierro, yodo, cobre, cobalto, magnesio, manganeso, selenio, cinc;
- secretolíticos, agentes secretomotores, preferentemente extractos de la raíz de regaliz, tomillo, aceite de menta piperita;
- agentes broncoespasmolíticos, preferentemente extractos de hojas de hiedra, caléndula, viola;
- vitaminas, preferentemente vitamina A, B, C, D, E, K;
- 50 - antioxidantes, preferentemente luteína, zeaxantina, bioflavonoides, extractos de semillas de uvas; y
- mediadores del gusto, preferentemente, un agente artificial o natural, más preferentemente un agente edulcorante, más preferentemente un azúcar o un edulcorante de poliol.

Los extractos para usar en la presente invención pueden administrarse del mismo modo que otros fármacos químicos o extractos vegetales y composiciones farmacéuticas de los mismos.

En una realización preferida, el extracto o composición farmacéutica para usar de acuerdo con la invención se administra por vía oral, tópica, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intranasal, mediante inhalación o como pulverización, preferentemente por vía oral, mediante inhalación, por vía tópica o intranasal.

Se prefiere que el extracto o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la invención sea una forma farmacéutica seleccionada entre el grupo que consiste en una pulverización, un aerosol, una espuma, un inhalante, un polvo, un comprimido, una cápsula, una cápsula de gelatina blanda, un té, un jarabe, un gránulo, un comprimido masticable, una pomada balsámica, una crema, un gel, un supositorio, una pastilla masticable, una composición de liposomas o una solución adecuada para la inyección, preferentemente en una forma farmacéutica de liberación temporalizada o de liberación continua de lo anterior.

Aunque se cree que todos los tipos de aplicaciones del medicamento son adecuados para usar de acuerdo con la invención, se prefieren las administraciones orales, tópicas, inhaladoras e intranasales para muchos fines, y el extracto se puede usar como tal o en dilución con aditivos sólidos y/o líquidos y/o contienen aditivos, transportadores, adyuvantes, excipientes y/u otros constituyentes farmacológicamente activos.

En una realización más preferida, el extracto o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la invención es una forma farmacéutica seleccionada entre el grupo que consiste en un comprimido, una cápsula, un polvo, un gránulo, un té, un jarabe, un aerosol, un inhalante, una pulverización, y una forma farmacéutica de liberación temporalizada o de liberación continua de lo anterior.

El extracto o la composición farmacéutica para usar en la presente invención es para usar en el tratamiento de una infección vírica, preferentemente una infección vírica del tracto respiratorio o una infección cutánea vírica, más preferentemente una rinitis vírica o una sinusitis vírica, que comprende la etapa de administrar un extracto de *Petasites* o una composición del mismo, preferentemente un extracto de *Petasites* o una composición para usar como se ha descrito anteriormente, a un mamífero, preferentemente un ser humano que lo necesita en una cantidad eficaz.

El término "tratamiento" como se usa en el presente documento se refiere al tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad o dolencia médica. Por ejemplo, el extracto o la composición para usar de acuerdo con la presente invención puede administrarse antes o después de una infección a fin de inhibir o aliviar las consecuencias fisiológicas inducidas por el virus, en particular, las reacciones inflamatorias inducidas por el virus.

A continuación, la invención se ilustrará con más detalle mediante ejemplos prácticos y con referencia a figuras, ninguna de las cuales debe interpretarse como limitante del alcance de la invención más allá de las reivindicaciones que se adjuntan.

Figuras

Las **Figs. 1a a c** muestran placas de TLC (gel de sílice 60, eluyente de tolueno/acetato de etilo 93:7) de diferentes extractos de *Petasites* visualizados a una longitud de onda de 254 nm (**1a**), con luz diurna (**1b**) y a una longitud de onda de 366 nm (**1c**). Leyenda: Carril 1: referencia: isopetasina, Carril 2: extracto de *Petasites* polar (extracción etanólica de *P. hybridus*, fase polar), Carril 3: extracto de *Petasites* polar (extracción etanólica de *P. hybridus*, disolvente extraído con aceite de colza), Carril 4: extracto de *Petasites* no polar (extracción etanólica de *P. hybridus*, fase no polar), Carril 5: extracto de *Petasites* no polar (extracto nativo de hojas de *P. hybridus* procedente de extracción con dióxido de carbono), Carril 6: referencia: ácido linoleico

La **Fig. 2** muestra el nivel de expresión del factor estimulador de colonias de granulocitos (GCSF) en células epiteliales nasales 24 h después de la administración de cualquiera de ácido poliinosínico:policitidílico (Poly IC) con o sin coadministración del extracto de *Petasites* no polar "Ze 339" ("Tesalin"). Los asteriscos indican un valor p de 0,01 a n = 5-8.

La **Fig. 3** muestra el nivel de expresión de la proteína 1 β inflamatoria de macrófagos (MIP-1 β) en células epiteliales nasales 24 h después de la administración de cualquiera de ácido poliinosínico:policitidílico (Poly IC) con o sin coadministración del extracto de *Petasites* no polar "Ze 339" ("Tesalin"). Los asteriscos indican un valor p de 0,01 a n = 5-8.

La **Fig. 4** muestra el nivel de expresión de la interleuquina 6 (IL-6) en células epiteliales nasales 24 h después de la administración de cualquiera de ácido poliinosínico:policitidílico (Poly IC) con o sin administración de extracto de *Petasites* no polar "Ze 339" ("Tesalin"). Los asteriscos indican un valor p de 0,01 a n = 5-8.

La **Fig. 5** muestra el nivel de expresión de la interleuquina 1 α (IL-1 α) en células epiteliales nasales 24 h después de la administración de cualquiera de ácido poliinosínico: policitidílico (Poly IC) con o sin la coadministración del extracto de *Petasites* no polar "Ze 339" ("Tesalin"). Los asteriscos indican un valor p de 0,05 a n = 5-8.

La **Fig. 6** muestra el nivel de expresión del factor α de necrosis tumoral (TNF- α) en células epiteliales nasales 24 h después de la administración de cualquiera de ácido poliinosínico:policitidílico (Poly IC) con o sin coadministración del extracto de *Petasites* no polar "Ze 339" ("Tesalin"). Los asteriscos indican un valor p de 0,01 a n = 5-8.

La **Fig. 7** muestra el nivel de expresión del ligando 5 de quimioquina (motivo C-C) (CCL5) en células epiteliales nasales 24 h después de la administración de cualquiera de ácido poliinosínico:policitidílico (Poly IC) con y sin coadministración del extracto de *Petasites* no polar "Ze 339" ("Tesalin"). Los asteriscos indican un valor p de 0,05 a n = 8.

La **Fig. 8** muestra el nivel de expresión de la proteína 1 α inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α) en células epiteliales nasales 24 h después de la administración de cualquiera de ácido poliinosínico:policitidílico (Poly IC) LyoVec™ (InvivoGen, Francia) con o sin coadministración de extracto de *Petasites* no polar "Ze 339" ("Tesalin"). Los asteriscos indican un valor p de 0,05 a n = 5-8.

La **Fig. 9** muestra el nivel de expresión de interleuquina 6 (IL-6) en células epiteliales nasales 24 h después de la administración de cualquiera de ácido poliinosínico:policitidílico (Poly IC) LyoVec™ (InvivoGen, Francia) con o sin coadministración del extracto de *Petasites* no polar "Ze 339" ("Tesalin"). Los asteriscos indican un valor p de 0,05 a n = 5-8.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Preparación de extracto de Petasites no polar "Ze 339"

5 Cantidades pesadas con precisión de hojas de *Petasites hybridus* molidas y adsorbente se transfirieron a recipientes de extracción de la planta de extracción con dióxido de carbono. Se llevó a cabo la extracción con dióxido de carbono subcrítico bajo presión a una temperatura predefinida durante 2-3 h con una cantidad definida de dióxido de carbono por kg de sustancia vegetal y un flujo definido de dióxido de carbono. En la siguiente etapa de proceso, el extracto y el dióxido de carbono se separaron bajo presión a una temperatura definida. Durante la separación se recogieron sublotos de extracto nativo en un recipiente de acero inoxidable. Después de la separación, se homogeneizaron los extractos mezclando a una temperatura máxima de 40 °C. Se llevó a cabo la homogeneización hasta que la solución fue transparente y se evaporó todo el dióxido de carbono.

Ejemplo 2 - Análisis por TLC de extractos de Petasites

15 **Métodos:** 5 µl de una muestra de extracto de *Petasites* (5 ml de un extracto de *Petasites* polar (extracción etanólica de *P. hybridus*, fase inferior), 5 µl de un extracto de *Petasites* polar (extracción etanólica de *P. hybridus*, disolvente extraído con aceite de colza), 5 µl de un extracto de *Petasites* no polar (extracción etanólica de *P. hybridus*, fase superior), 5 µl de un extracto de *Petasites* no polar (extracto nativo de hojas de *P. hybridus* procedente de la extracción con dióxido de carbono)), que contenía 5 mg de una muestra de extracto de *Petasites* por 1 ml de metanol se añadieron a la línea de salida de una placa de vidrio de gel de sílice 60 F254 (obtenida de la compañía Merck) para cromatografía en capa fina (TLC). Isopetasina y ácido linoleico se mancharon simultáneamente sobre las placas como compuestos de referencia. Después las muestras se secaron al aire sobre la placa de TLC, la placa se introdujo en una cámara de vidrio de TLC precargada con el eluyente (tolueno/acetato de etilo en una relación de 93:7) y se eluyó sin saturación de la cámara a temperatura ambiente. La cámara de TLC se cerró con una tapa. Después, el frente del disolvente se hizo viajar a una distancia de 5,6 cm sobre la placa de TLC, determinado desde la línea de partida, la placa de TLC se retiró de la cámara y se secó a 140 °C en una placa calefactora durante aproximadamente 30 segundos, la placa de TLC se sumergió en un reactivo de inmersión (Anisaldehído: ácido acético: metanol: ácido sulfúrico 0,5 : 10 : 85 : 5 (V/V/V/V)) y se reveló a 140 °C en la placa calefactora durante aproximadamente 50 segundos. Se detectaron las sustancias cromatográficamente separadas mediante irradiación de luz diurna así como de luz a 254 nm y 366 nm de longitud de onda.

20 **Resultados:** Las **Figs. 1a a c** muestran imágenes de las placas de TLC. Extractos de *Petasites* polares (Carriles 2 y comprende solo con componentes con valores de Rf de aproximadamente 0. Los extractos de *Petasites* no polares muestran adicionalmente una multitud de componentes con valores Rf entre 0,1 y 1. Además, isopetasina (como ejemplo de un isómero de petasina, compuesto de referencia en el Carril 1) no está presente en los extractos de *Petasites* polares (Carriles 2 y 3) pero está claramente presente en los extractos de *Petasites* no polares (Carriles y 5). Por tanto, los extractos de *Petasites* se pueden distinguir claramente en extractos de *Petasites* polares y no polares mediante el análisis por TLC anteriormente descrito.

Ejemplo 3 - Determinación de los efectos antiinflamatorios de un extracto de Petasites no polar sobre células epiteliales nasales humanas - Estimulo vírico Poly IC

45 **Métodos:** Células epiteliales nasales humanas procedentes de biopsias de cirugía de turbinoplastia se cultivaron en medio basal para células epiteliales nasales humanas (Promocell®) incluyendo antimicóticos/antibióticos (1 %) y gentamicina (0,5 %). Para la estimulación, las células se sembraron sobre placas de cultivo de 6 pocillos (250 000-170 000 células/pocillo) o placas de cultivo de 24 pocillos (62 000 - 42 000 células/pocillo) en 1 ml de medio basal y se incubaron durante al menos 12 h. Después, las células se cultivaron durante 24 h en 1 ml de medio basal (no tratado) o se estimularon adicionalmente con 10 µg/ml de ácido poliinosínico:policitidílico (Poly IC) a 37 °C en presencia y ausencia del extracto de *Petasites* no polar "Ze 339" ("Tesalin") (3 µg/ml). Se sabe que el estimulante vírico Poly IC interactúa con el receptor 3 de tipo toll receptor (TLR3), que se expresa en las membranas de los linfocitos B, macrófagos y células dendríticas. El Poly IC, como estimulante vírico, estimula por tanto el sistema inmunitario del hospedador infectado por el virus mediante la ruta del TLR3, de la que se sabe en general que está implicada en múltiples rutas inflamatorias (Lee J. *et al.*, 2012, Cell, 151, 547-58). Los experimentos se iteraron 8 veces. El medio basal para células epiteliales nasales humanas se usó como control. La medición de los niveles de citoquina y quimioquina se realizó de la siguiente forma: Los niveles de CCL-5 se midieron por ELISA (BD Bioscience) y (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido). Los niveles de MIP-1β, IL-1 α, IL-6, GCSF y TNF-α se midieron con un ensayo multiplexado (Panel de perlas magnéticas MILLIPLEX MAP para citoquinas/quimioquinas humanas). Los ensayos se realizaron según las instrucciones de los fabricantes con patrones y muestras por duplicado, incubación nocturna con agitación a 4 °C (18 h, 750 rpm) y uso de un bloque magnético manual para las etapas de lavado. Los datos se adquirieron con un sistema Bio-Plex 200 validado y calibrado (Bio-Rad, EE.UU.) y se analizaron con el programa informático Bio-Plex Manager 6.0 (Bio-Rad, EE.UU.).

50 **Resultados:** La administración del extracto de *Petasites* no polar "Ze 339" ("Tesalin") junto con el estimulante vírico Poly IC redujo significativamente los niveles de expresión de las citoquinas inflamatorias típicas GCSF, MIP-1β, IL-6, IL-1α, TNF-α y CCL5, cuando se compararon con la administración de Poly IC en solitario (véanse las **Figs. 2 a 7**). Por lo tanto, Los extractos de *Petasites* demostraron la disminución de las cantidades expresadas de los mediadores

de la inflamación inducidos por virus *ex vivo* en células epiteliales nasales humanas vivas y, por tanto, son eficaces para el tratamiento de infecciones víricas.

5 Ejemplo 4 - Determinación de los efectos antiinflamatorios de un extracto de *Petasites* no polar sobre células epiteliales nasales humanas - Poly IC LyoVec™ (Invivo-Gen, Francia)

10 **Métodos:** Células epiteliales nasales humanas procedentes de biopsias de cirugía de turbinoplastia se cultivaron como se ha descrito en el Ejemplo 3. Las células se estimularon durante 24 h a 37 °C con ácido poliinosínico:policitidílico (Poly IC) LyoVec™ (InvivoGen, Francia) a 10 µg/ml en presencia y ausencia de 2 µg/ml del extracto de *Petasites* no polar "Ze 339" ("Tesalin"). El estimulante vírico Poly IC LyoVec™ (InvivoGen, Francia) es un polímero de ARN sintético bicatenario que se detecta mediante el gen I inducible por ácido retinoico (RIG-1)/receptor de la proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma (MDA5) en el hospedador infectado por virus, que funciona como un receptor de reconocimiento de patrones reconociendo el ARN bicatenario y es, por tanto, un sensor comúnmente aceptado para virus (Gitlin L. *et al.*, 2008, PNAS, 103, 8459-8464; Kato H. *et al.*, 2005, *Immunity*, 23, 19-28; Kato H. *et al.*, 2008, J. Exp. Med., 205, 1601-1610). Los experimentos se iteraron 8 veces. El medio basal para células epiteliales nasales humanas se usó como control. La medición de los niveles de citoquina y quimioquina se realizó de la siguiente forma: Los niveles de MIP-1α e IL-6 se midieron con un ensayo multiplexado (Panel de perlas magnéticas MILLIPLEX MAP para citoquinas/quimioquinas humanas). Los ensayos se realizaron según las instrucciones de los fabricantes con patrones y muestras por duplicado, incubación nocturna con agitación a 4 °C (18 h, 750 rpm) y uso de un bloque magnético manual para las etapas de lavado. Los datos se adquirieron con un sistema Bio-Plex 200 validado y calibrado (Bio-Rad, EE.UU.) y se analizaron con el programa informático Bio-Plex Manager 6.0 (Bio-Rad, EE.UU.).

25 **Resultados:** La administración del extracto de *Petasites* "Ze 339" ("Tesalin") junto con el estimulante vírico Poly IC LyoVec™ (InvivoGen, Francia) redujo significativamente los niveles de expresión de las citoquinas inflamatorias típicas MIP-1α e IL-6, cuando se compararon con la administración de Poly IC LyoVec™ (InvivoGen, Francia) en solitario (véanse las **Figs. 8 y 9**). Por lo tanto, Los extractos de *Petasites* demostraron la disminución de las cantidades expresadas de los mediadores de la inflamación inducidos por virus *ex vivo* en células epiteliales nasales humanas vivas también para un estimulante vírico diferente y, por tanto, son eficaces para el tratamiento de infecciones víricas.

30 Ejemplo 5 - Determinación de los efectos antiinflamatorios de un extracto de *Petasites* no polar sobre células epiteliales nasales humanas - Estimulo bacteriano Pam(3)CSK(4), flagelina y el oligonucleótido CpG

35 **Métodos:** Células epiteliales nasales humanas obtenidas de biopsias de cirugía de turbinoplastia se cultivaron como se ha descrito en el Ejemplo 3. El procesamiento y la estimulación de las células se realizaron en las mismas condiciones que las descritas en el Ejemplo 3. Las células se estimularon específicamente durante 24 h a 37 °C con 200 ng/ml de Pam(3)CSK(4), 5 µg/ml de flagelina y el oligonucleótido CpG a 1-5 µM en presencia y ausencia de 3 µg/ml del extracto de *Petasites* no polar "Ze 339" ("Tesalin").

40 **Resultados:** La administración del extracto de *Petasites* no polar "Ze 339" ("Tesalin") junto con el estímulo bacteriano Pam(3)CSK(4), flagelina y el oligonucleótido CpG no mostró reducción en el nivel de expresión de las citoquinas GCSF, MCP-1, IL-1α, IL-6, IL-8, IP-10 y TNFα, cuando se comparó con la administración del estímulo bacteriano en solitario. Por lo tanto, el extracto de *Petasites* no es capaz de disminuir la cantidad expresada de mediadores de la inflamación inducidos por bacterias *ex vivo* en células epiteliales nasales vivas y, por tanto, son específicamente eficaces para el tratamiento de infecciones víricas.

45 En conclusión, el extracto de *Petasites* es específicamente reactivo con inflamaciones inducidas por virus y las rutas de inflamación normalmente activadas de forma bacteriana no se ven afectadas por la administración del extracto de *Petasites*.

REIVINDICACIONES

1. Extracto de *Petasites* para usar en el tratamiento de una enfermedad vírica de un mamífero, preferentemente humana.
2. El extracto de *Petasites* para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el extracto de *Petasites* está libre de alcaloides de pirrolizidina.
3. El extracto de *Petasites* para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el extracto de *Petasites* es un extracto de *Petasites* no polar, preferentemente producido por extracción con dióxido de carbono líquido, más preferentemente mediante extracción con dióxido de carbono líquido en condiciones de temperatura subcrítica.
4. El extracto de *Petasites* para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el extracto de *Petasites* se obtiene de plantas y/o partes de plantas seleccionadas del grupo que consiste en *Petasites hybridus*, *Petasites albus*, *Petasites amplus*, *Petasites fragrans*, *Petasites formosanus*, *Petasites frigidus*, *Petasites georgicus*, *Petasites japonicus*, *Petasites laevigatus*, *Petasites kablikianus*, *Petasites niveus*, *Petasites paradoxus*, *Petasites pyrenaicus*, *Petasites tricholobus*, *Petasites radiates*, *Petasites sagittatus* y *Petasites spurius*.
5. El extracto de *Petasites* para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la enfermedad vírica es una enfermedad respiratoria vírica o una enfermedad cutánea vírica.
6. El extracto de *Petasites* para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la enfermedad respiratoria vírica se selecciona del grupo que consiste en
- reagudización de enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias producidas por virus, sinusitis crónica producida por virus, pólipos en los senos nasales producidos por virus, infecciones rinovíricas, infecciones por gripe y paragripales, infecciones por virus sincitial respiratorio (VSR), infecciones por adenovirus, infecciones de la familia del virus del herpes, preferentemente herpes simple y herpes zóster, infecciones por rotavirus, enterovirus, preferentemente virus coxsackie, infecciones por el virus del papiloma humano (VPH), preferentemente seleccionadas del grupo que consiste enfermedades del tracto aerodigestivo superior y sinusal, incluyendo otitis media con y sin supuración, rinitis, rinosinusitis, gingivostomatitis, aftosis, faringitis, amigdalitis, faringoamigdalitis, laringitis, traqueítis, bronquitis, bronconeumonía, neumonía, gripe, rinitis y resfriado común.
7. El extracto de *Petasites* para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la enfermedad cutánea vírica se selecciona del grupo que consiste en infecciones de la familia del virus del herpes de tipos 1 y 2, lesiones por herpes zóster, preferentemente, infecciones por herpes en el contexto de eccema atópico, molusco contagioso y lesiones asociadas con el virus del papiloma humano (VPH), preferentemente condilomas y verrugas producidas por el VPH incluyendo serotipos de riesgo alto y bajo.
8. El extracto de *Petasites* para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la enfermedad vírica da como resultado una inflamación que implica un receptor seleccionado entre el grupo que consiste en la familia de receptores de tipo toll (TLR) y la familia de receptores análogos al gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I), preferentemente receptor 3 de tipo toll (TLR3), RIG-I y la proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma (MDA5).
9. Una composición farmacéutica que comprende un extracto de *Petasites* para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y opcionalmente un excipiente fisiológicamente aceptable.
10. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la composición comprende de 5 a 600 mg de extracto de *Petasites*, preferentemente de 10 a 500 mg, más preferentemente de 200 a 300 mg.
11. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en donde la composición comprende adicionalmente al menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en
- antiflogísticos, analgésicos, agentes reductores de la fiebre;
 - extractos de *chamomilla recutita*, *rizoma de curcumae longae*, *rizoma de curcumae canthorrhizae*, *curcumae canthorrhiza*, *cortex salicis*, *salicis purpurea*, *salicis daphenoides*, *tanacetum parthenium*;
 - elementos traza, preferentemente sales de hierro, yodo, cobre, cobalto, magnesio, manganeso, selenio, cinc;
 - secretolíticos, agentes secretomotores, preferentemente extractos de raíz de regaliz, tomillo, aceite de menta piperita;
 - agentes broncoespasmodiolíticos, preferentemente extractos de hojas de hiedra, *caléndula*, *viola*;
 - vitaminas, preferentemente vitamina A, B, C, D, E, K;
 - antioxidantes, preferentemente luteína, zeaxantina, bioflavonoides, extractos de semillas de uvas; y
 - mediadores del gusto, preferentemente, un agente artificial o natural, más preferentemente un agente edulcorante, más preferentemente un azúcar o un edulcorante de poliol.
12. El extracto para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o la composición farmacéutica para

usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el extracto o la composición se administra por vía oral, tópica, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intranasal, mediante inhalación o como pulverización, preferentemente por vía oral, mediante inhalación, por vía tópica o intranasal.

- 5 13. El extracto para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el extracto o la composición es una forma farmacéutica seleccionada del grupo que consiste en una pulverización, un aerosol, una espuma, un inhalante, un polvo, un comprimido, una cápsula, una cápsula de gelatina blanda, un té, un jarabe, un gránulo, un comprimido masticable, una pomada balsámica, una crema, un gel, un supositorio, una pastilla masticable, una composición de liposomas o una solución adecuada para la inyección, preferentemente en una forma farmacéutica de liberación temporalizada o de liberación continua de lo anterior.
- 10
14. El extracto o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el extracto o la composición es una forma de dosificación seleccionada del grupo que consiste en un comprimido, una cápsula, un polvo, un gránulo, un té, un jarabe, un aerosol, un inhalante, una pulverización, y una forma farmacéutica de liberación temporalizada o de liberación continua de lo anterior.
- 15

Fig. 1a

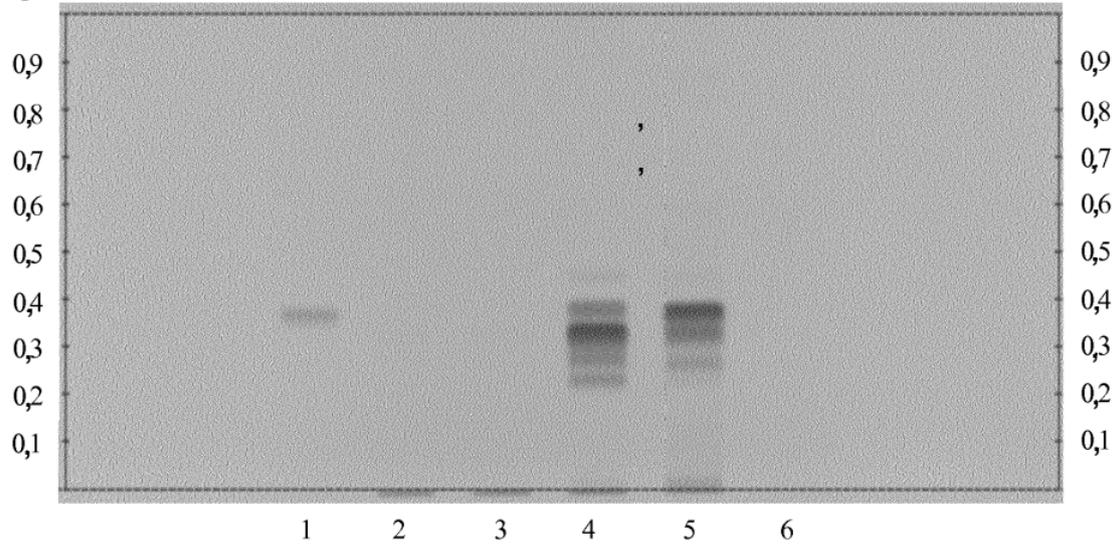


Fig. 1b

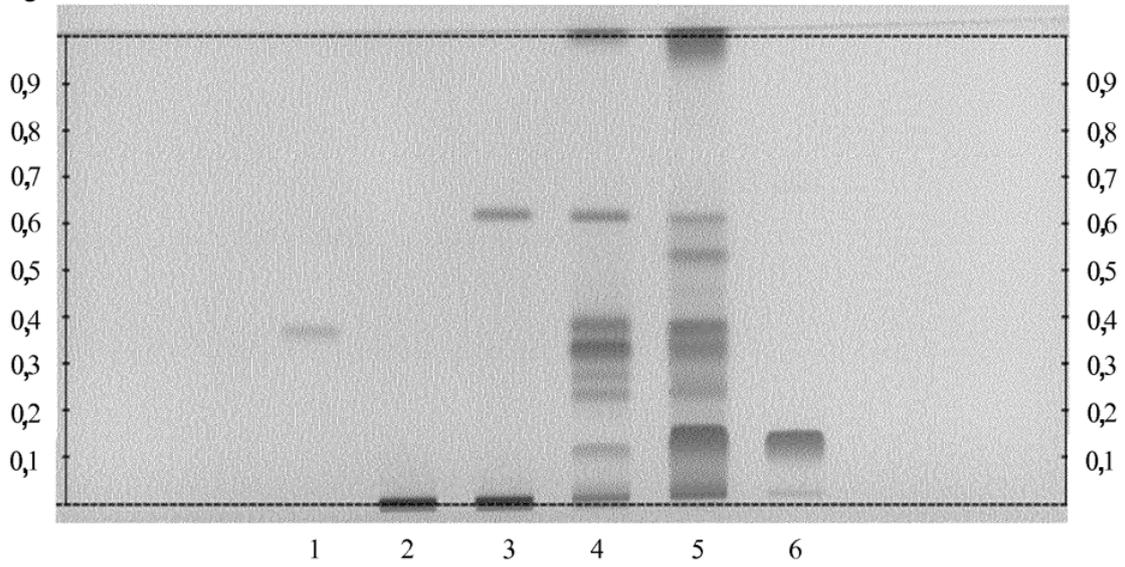


Fig. 1c

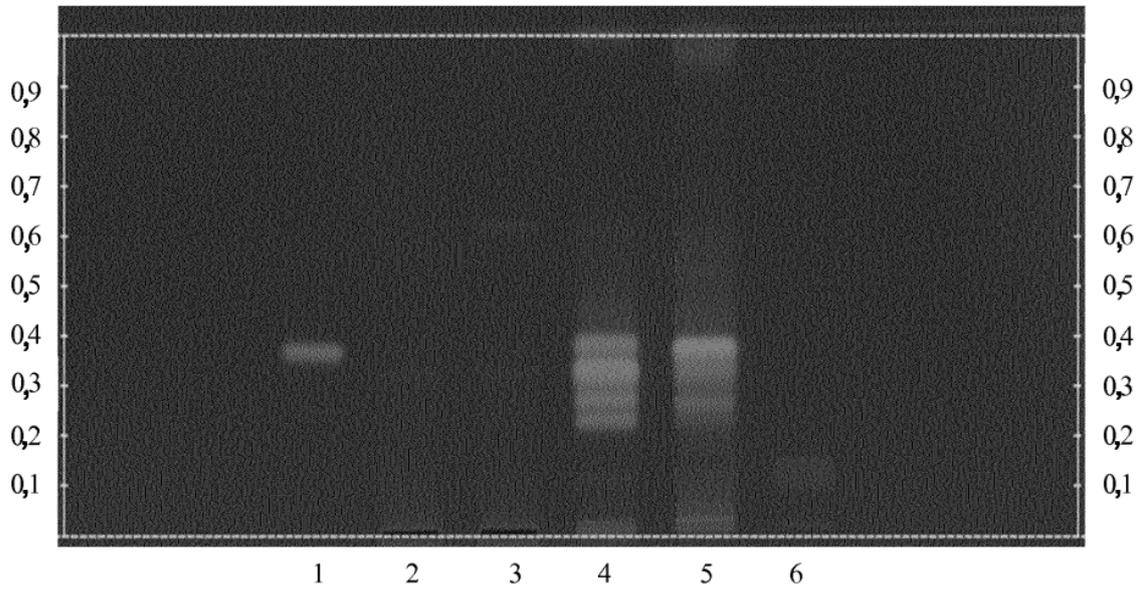


Fig. 2

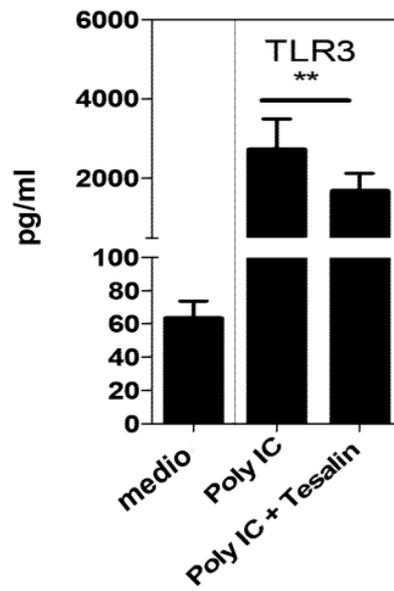


Fig. 3

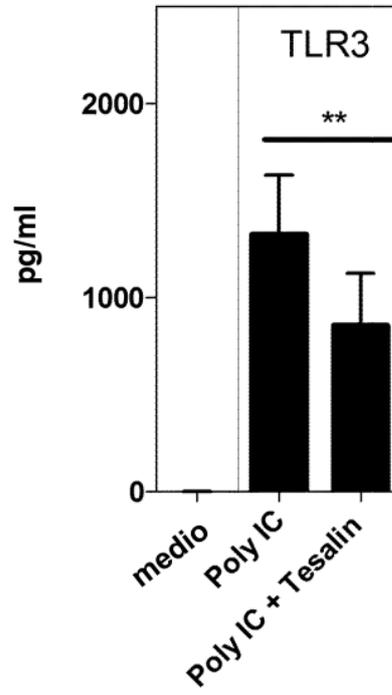


Fig. 4

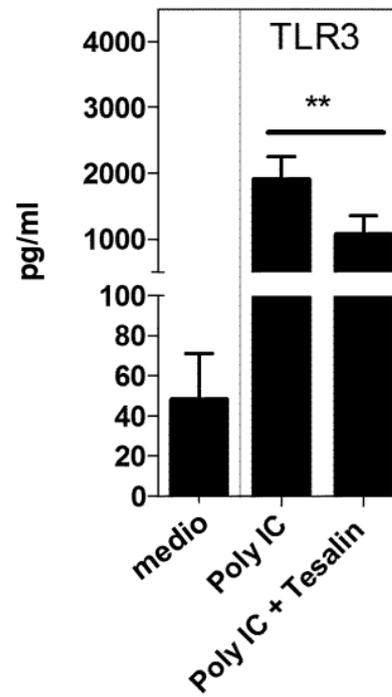


Fig. 5

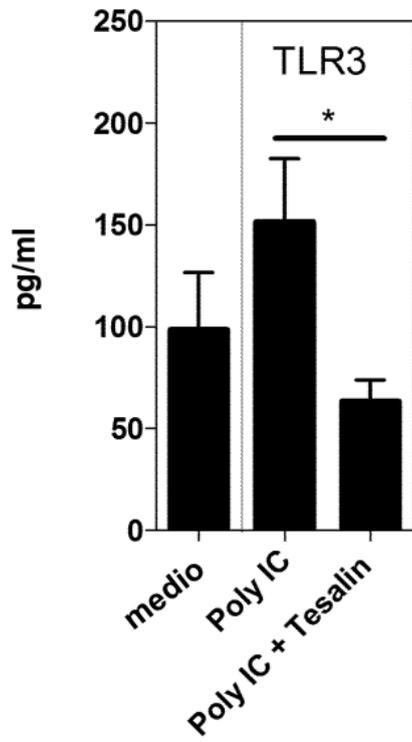


Fig. 6

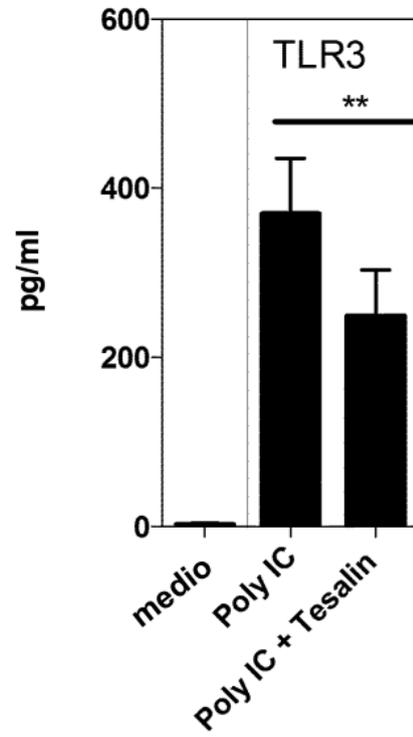


Fig. 7

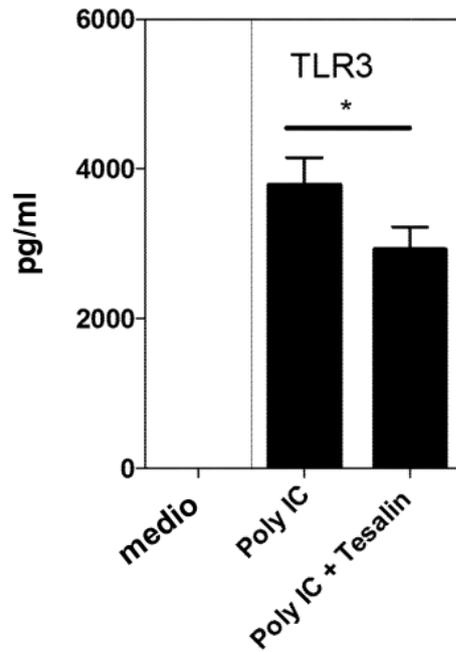


Fig. 8

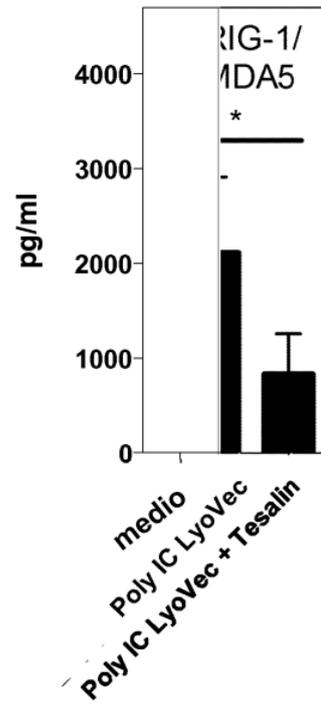


Fig 9

