



TÍTULO DE PATENTE No. 369851

Titular(es): SECRETARIA DE EDUCACIÓN PÚBLICA-TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Domicilio: Arcos de Belén Núm. 79 Piso 3, Colonia Centro, 06010, Delegación Cuauhtémoc, Distrito Federal, MÉXICO

Denominación: FRACCIÓN BIOACTIVA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *RHOEO DISCOLOR* CON ACTIVIDAD ANTI-INFLUENZA.

Clasificación: **CIP:** A61K36/88; A61P31/16
CPC: A61K36/88; A61P31/16

Inventor(es): VICTOR MANUEL RUÍZ VALDIVIEZO; YAZMÍN SÁNCHEZ ROQUE; TERESA DEL ROSARIO AYORA TALAVERA; ROCIO MEZA GORDILLO; REINER RINCÓN ROSALES

SOLICITUD

Número:
MX/a/2015/017551

Fecha de Presentación:
17 de Diciembre de 2015

Hora:
10:12

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 17 de diciembre de 2035

Fecha de Expedición: 21 de noviembre de 2019

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracción III, 7º BIS 2 y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso ii), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso ii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º inciso a) y antepenúltimo párrafo, del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7 BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 30 de su Reglamento, y 1 fracción III, 2 fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:
EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|00001000000405397295|Servicio de Administración Tributaria|56||MX/2020/27154|MX/a/2015/017551|Título de patente normal|1223|GAGV|Pág(s)
1|jnmZbDnv2AUPNJbuk7HhWY39rHI=

Sello Digital:
QTSR2Q0pYPY5fnp//2mxf2uo7Zglx7uDGmZjSHqx/p1U1m3nWaoLVB2yuCidxMTPvhoDQD+Ug1i2SsU5HKvgrpmG
K5S2dMcZV88l4Y3FBt3dT12GvArKR0ETGfJtCmue9JOGiNP8CTG6O1ZV/USaLAesSsqj3wS9o6nnd9Nviq9FVRQtC
hV93r5LsEvcK9TX9gkPjVD3dVajWcz55HRbsNk7PDxepa5kfYQTXyOWys+0jPKP0bYchnkbROq/At7v8535/tR8Mn
I+PA4Nhj5TuYvKykkHEbXSsWKO0QmmRiy+PmlmEwVyrRD6BObLvNWbDcZzL0cfo2Yh2f3a6g==



MX/2020/27154

FRACCIÓN BIOACTIVA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Rhoeo discolor* CON ACTIVIDAD ANTI-INFLUENZA

5

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se basa en una fracción bioactiva proveniente del extracto metanólico de las hojas de la planta *Rhoeo discolor*, el cual presenta actividad antiviral contra el virus de la influenza A, H1N1, debido a la presencia de metabolitos secundarios identificados, responsables de la actividad biológica, así también la fracción bioactiva será empleada para la preparación de medicamentos enfocados al tratamiento contra este virus.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

15 Fracción bioactiva proveniente del extracto metanólico de las hojas de la planta *Rhoeo discolor* de aplicación en la industria farmacéutica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Las plantas medicinales son aquellos vegetales que poseen principios activos con una acción farmacológica a favor de la salud (Juárez et al. 2013), el uso de estas plantas con fines terapéuticos obliga a la urgente necesidad de realizar estudios científicos con el objetivo de descubrir los compuestos contenidos en las especies y que puedan tener aplicación farmacéutica (Juárez et al. 2013), La industria farmacéutica actual se ha basado en los conocimientos tradicionales herbolarios para la síntesis de fármacos, y el proceso de verificación científica continúa hoy en día, descubriéndose constantemente nuevas aplicaciones a favor de la salud.

En el mundo las plantas medicinales son de gran importancia debido a varias razones. Los metabolitos secundarios de las plantas son un recurso importante de las industrias farmacéuticas, experimentado en el comercio medicinal un incremento a nivel mundial en los últimos 15 años. Según la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (UNIDO), el 80% de la población de los países en

desarrollo continúan utilizando plantas medicinales en la forma tradicional. Los productos naturales actualmente representan estrategias comerciales y se han implementado en programas de salud alternativa en países desarrollados sin excluir a los no desarrollados. Por lo que la demanda de plantas medicinales ha crecido en Europa y todo el mundo (Alonso et al. 2012).

- 5 En México socialmente de acuerdo con cifras de la Secretaría de Salud, confirman que en el rubro de la salud para el 70% de la población nacional es el único recurso con el que cuentan (Juárez et al. 2013). Dentro de este amplio grupo de plantas medicinales se encuentra la familia commelinaceae la cual comprende un grupo de 44 géneros y 600 especies, especialmente *Rhoeo discolor* L., se caracteriza por poseer hojas angostas en la base de color púrpura, con tendencia a doblarse longitudinalmente sobre sí mismas; inflorescencias terminales de color blanca, la planta *R. discolor* se ubica en centro América y
- 10 Europa. En la República Mexicana, ha sido localizado en los estados de Chiapas, Puebla, Tabasco, Yucatán, Quintana Roo y Veracruz (Del Pero and Swain, 1985; Fowler et al. 2013). Se caracterizan por contener metabolitos secundarios tales como flavonoides, cumarinas, taninos condensados y saponinas, estos son investigados por presentar importantes aplicaciones medicinales,
- 15 como antiinflamatorios e infecciones del aparato digestivo, antirradicales, antioxidantes, antimicrobianas y antiviral, es en este último beneficio en el que se centra la presente invención específicamente sobre el virus de la influenza el cual se caracteriza por ser pleomórficos poseer un ARN segmentado que se convierte en el principal causante de las variaciones antigénicas las cuales se han generado de las diferentes combinaciones de las 19 hemaglutininas y 9 neuraminidasas conocida hasta el momento por lo
- 20 que cada vez es más difícil combatir a este virus con los medicamentos sintéticos que se encuentran en el mercado tales como el Oseltamivir, pues estos virus cada vez son más resistentes a este fármaco, es por ello que surge la inquietud de emplear la medicina alternativa a partir de las plantas medicinales el cual podría ser beneficioso para combatir a este virus. Actualmente, investigaciones científicas han demostrado el efecto anti-influenza de plantas que forman parte de la familia commelinaceae,
- 25 basandonos en el trabajo realizado por Guo-Bin et al. (2010) en su estudio con ratones infectados por el virus de la influenza administrando extracto de *Commelina communis* (EMC) demostró inhibición de IFN- γ debido al reflejo de la actividad antiviral, ya que la influenza es conocido por inducir altos niveles IFN- γ . Así también por previos reportes se sabe que los flavonoides son los metabolitos de mayor abundancia en la familia commelinaceae (Swain et al., 1985) además se tiene conocimiento que flavonoides como la

isoquercetina y la quercetina han sido capaces de inhibir la replicación del virus de la gripe (Kim et al. 2010; Kumar et al. 2005; Kumar et al. 2003). Zi-Feng et al. (2014) demostraron a través de comparaciones *in vitro* de diferentes estructuras químicas de metabolitos secundarios contra el virus de la gripe, que los flavonoles rígidos (kaempferol, quercetina y miricetina) muestran efecto inhibitor mucho más fuerte que el efecto de los flavonoides flexibles (catequina y epicatequina) debido a la funcionalidad del hidroxilo en la posición C-4' en el anillo B, un doble enlace en C-2-C-3, y una cetona en la posición C-4 es esencial para la inhibición de virus de la influenza. Es por esto que *Rhoeo discolor* L. es una alternativa debido a su efecto antiviral contra el virus de la influenza A H1N1.

- 10 Considerando lo antes expuesto, Algunas patentes previas relacionadas con la obtención de extractos y fracciones bioactivas de plantas con actividad biológica, antiviral específicamente contra el virus de la influenza A, H1N1 son las siguientes:

WO 2013029634 A2: Natural antioxidant anti-influenza composition. Vivanco R. F.; Andrade E. R.

- 15 La presente invención se refiere a una composición a partir del extracto de *Myrciaria dubia* y *Equinacea purpurea* que presenta efecto sinérgico. La composición de acuerdo con la presente invención posee propiedades antigripales y antioxidantes potenciadas, así como una alta capacidad inmunoestimulante.

EP1600454 A1: Anti-influenza virus compound comprising biflavonoid-sialic acid glycoside. Takayuki N.;

- 20 Takahashi K.; Yamada H.

La invención se refiere a un compuesto caracterizado porque comprende un glucósido de ácido siálico de biflavonoide. El glucósido de ácido siálico de biflavonoide muestra una actividad anti-virus de la gripe no sólo en un sistema *in vitro* utilizando células cultivadas, sino también en un sistema *in vivo* utilizando un ratón. Por lo tanto, es útil como preventivo o remedio para la gripe y por otra parte, útil en alimentos y
25 bebidas para prevenir o tratar la influenza.

WO 2009036772 A1: Anti-aids, anti-tumour, immune-system-stimulating herbal composition and production method therefor. Vivanco, R.F.; Andrade B. R.; Sandoval D. P.

La invención se refiere al desarrollo de una selecta composición de plantas obtenidas partiendo de fuentes silvestres, por medio de meristemas y sus extractos obtenidos por procesos mejorados, con sus principios activos generan un sinergismo que muestran propiedades de carácter antiinflamatorio, antiviral, estimulante del sistema inmunológico, promueven la salud prostática, y representan un soporte para mejorar la calidad de vida del individuo.

WO2011039629 A2: Bioactive fraction of *Petiveria alliacea*, pharmaceutical composition containing same, and combination with immunostimulants for treating cancer. Fiorentino, G.S.; Cifuentes, M.C.; Hernandez, J.F.; Santander, S.P.; Uruena, C.P.; Castañeda D.M.

La invención está relacionada con una fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* con actividad antitumoral y el uso de la misma para la fabricación de medicamentos para el tratamiento del cáncer. Adicionalmente, la solicitud incluye una combinación farmacéutica para el tratamiento del cáncer que comprende la fracción bioactiva de *Petiveria alliacea* y al menos un agente inmunoestimulante capaz de producir la maduración fenotípica y/o funcional de las células dendríticas.

WO1997045134 A1: The preparation of an extract used as a base material to obtain medicaments useful for the treatment of human ailment of viral origin. Jimenez, P.; Girbes, J. T.; Urizar, A.

La invención se refiere al procedimiento para la preparación de un extracto como base para la obtención de medicamentos para el tratamiento de dolencias humanas de origen vírico, del tipo de los preparados, jarabes, comprimidos, tabletas, polvo, caramelos y similares, utilizados como medicamentos para el tratamiento de enfermedades humanas de origen viral, que se compone de una fase de obtención de mezcla homogénea de frutos de sauco, corteza de ramas de sauco y hojas de sauco, una fase de troceado del material leñoso de dicha mezcla, una fase de adición de dicha mezcla a agua en ebullición, una fase de decocción de la mezcla, una fase de eliminación de sólidos del compuesto así obtenido, y el extracto así obtenido, así como los medicamentos obtenidos a partir de dicho extracto.

WO 2001021185 A1: New pharmacological activities of the extracts of *Curcuma longa* Quintanilla A.E.; Ramirez B.A.; Bernd A.; Pardo Z. J.; Díaz J. A.; Pamies M.D.; Gutiérrez M. A.; Sempere J. M.

La invención se refiere a nuevas actividades farmacológicas de los extractos de *Curcuma Longa* como agente antiproliferativo y fotosensibilizante y su uso en las patologías proliferativas como la psoriasis, así como reductora del Fibrinógeno plasmático y del cociente Apolipoproteína B/apolipoproteína A-I, sin alterar los demás parámetros de la coagulación.

5

WO 2014096488 A1: Phenolic extracts of *Uncaria tomentosa* L. (cat's claw) containing procyanidins, propelargonidins and flavanolignans, method for the production thereof, and applications of same. Monagas J.M; Sánchez F.; Quintanilla J.E.; Lebrón R.; Bartolomé B.; Navarro M.

Esta invención se refiere a extractos fenólicos conteniendo procianidinas, propelargonidinas y flavanolignanos, con propiedades/actividades potencialmente beneficiosas para la salud humana, y obtenidos a partir de las partes aéreas y de la madera interna de la planta *Uncaria tomentosa* L., así como al procedimiento de obtención de dichos extractos. Estos extractos son útiles para elaborar aditivos alimentarios, composiciones cosméticas y composiciones farmacéuticas con actividad antioxidante, antimicrobiana, citotóxica y antiproliferativa.

15

WO 2013147578 A1: Raw extract of a *sechium edule* hybrid, method for extracting same and use thereof for formulations having an antineoplastic effect. Aguiniga I.; Cadena J.; Santiago E.; Cisneros V.M.; Soto R.M.; Arevalo M. L. C.; Rivera A.R.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene un extracto crudo del híbrido H-387-07-GISem, producto de los cruzamientos entre las variedades: *Sechium edule* var. *virens* *levis* por *Sechium edule* var. *amarus silvestrys* y su resultante por *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*, el cual presenta actividad terapéutica como agente antineoplásico, dicha composición tiene un efecto mejorado respecto a sus progenitores y además no presenta efectos colaterales durante su administración.

25

WO 1996003999 A1: Method for obtaining apolar and polar extracts of *curcuma* and applications thereof. Quintanilla E.; Díaz J.

La obtención del extracto apolar comprende: (a) extracción de los rizomas con un disolvente orgánico; (b) filtración y evaporación a sequedad del extracto; (c) disolución de la oleoresina resultante en caliente, precipitación dejando enfriar y filtración del sólido; (d) secado y recristalización del sólido para obtener un producto con una pureza en curcuminoides superior al 90 %. La obtención del extracto polar comprende:

- 5 (a') extracción de los rizomas con agua a 50-70 °C y (b') filtrado y evaporación del agua. Aplicación en la fabricación de composiciones y preparados útiles como captadores de radicales libres y agentes antienviejecimiento, así como agentes reductores de los niveles plasmáticos de peróxidos lipídicos en humanos.

10 **Yarmolinsky et al, 2010:** Actividad anti-herpética de hojas de extractos acuosos y etanólicos de *C. fragrans* y *S. chinensis*

Los extractos etanólicos y acuosos se prepararon a partir de hojas de *C. fragrans* y *S. chinensis*. Los tejidos vegetales fueron aplastados, se incubaron a temperatura ambiente durante 48 horas en disolvente apropiado, se centrifuga a 2000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se evaporó por liofilizador. El sedimento se disolvió en la cantidad mínima de 95% de etanol (0,5 ml) o agua y se diluye con agua hasta
15 una concentración final de 10 mg/ml.

Gonzalez et al, 2003: Actividades antigenotóxicas y antimutagénicos del extracto crudo etanólico de *Rhoeo discolor*

20 El extracto etanólico fue elaborado en la misma manera que los extractos que se preparan para propósitos medicinales. Las hojas frescas cortadas en fragmentos (100 g) se extrajeron con 175 ml de etanol (96%) Durante 3 horas a 25°C. El extracto se filtró a través de papel Whatman No. 4, y se concentró con un evaporador al vacío a 60°C. El extracto etanólico se evaporó a 37 °C durante 12 horas y se mantuvo en un desecador con carbonato de 12 h hasta alcanzar un peso constante.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Efecto en la inhibición de la entrada del virus A/Yucatán/2370/09 en células MDCK infectadas a una MOI=0.01, co-tratadas con MF1 y 6´SLN. La concentración empleada de MF1 fue de 0.8785µg/mL y de 6´SLN fue de 200µg/mL. Los valores son la media $\pm$ SD de los resultados analizados de cada experimento por triplicado. Los promedios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Figura 2. Mecanismo de acción de la fracción MF1 proveniente del extracto metanólico de las hojas de la planta *Rhoeo discolor*, según los ensayos de unión y entrada del virus a la célula huésped usando como control positivo el glucopolímero 6´SLN (6-sialil-(N-acetilactosamina)) comprobado a través de la expresión del RNA viral por medio de la técnica de qRT-PCR.

Figura 3. Cromatograma del perfil metabolómico de la fracción MF1 del extracto crudo de las hojas de la planta *Rhoeo discolor*, a través de la técnica de UPLC-MS.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENSIÓN

La presente invención se refiere al uso de la fracción MF1 como potente inhibidor de la infección específico contra el virus de la influenza A H1N1, dicha fracción se obtiene del extracto metanólico (metanol al 100%) de las hojas de la planta *Rhoeo discolor* por medio de la metodología establecida por Fowler et al. (2013). Una vez obtenida el extracto metanólico se identifican metabolitos secundarios por medio de cromatografía de placa fina según lo establecido por Harbone. (1990), a través de esta técnica se logró identificar a 4 grupos de metabolitos secundarios los cuales son flavonoides, taninos, cumarinas y saponinas. Una vez identificados dichos metabolitos se procede a cuantificarlos por medio de espectrofotometría a través de metodologías establecidas por Singleton et al. (1999); Chang et al. (2002); Sherman & Kowalska. (2008) y Wagner & Bladt. (1996), desarrollando dichas metodologías se observa el contenido de fenoles totales, flavonoides y saponinas de 2.25mg/g, 0.67mg/g, 10.32mg/g de materia seca respectivamente, mientras que las concentraciones de taninos y cumarinas fueron de 0.67 mg/g,

0.47mg/g de materia seca respectivamente. Después de los análisis fitoquímicos se extrae la fracción MF1 por medio de cromatografía en capa fina preparativa de acuerdo a lo establecido por Samoilova et al. (2011) empleando una fase móvil con un sistema de solventes formado por cloroformo: metanol: hidróxido de amonio en una relación 85:14:1, respectivamente. La primera fracción eluída de color verde oscuro que se ubica en la parte superior de la placa se denomina MF1 quien representa la fracción bioactiva con actividad anti-influenza.

Una vez extraída la fracción MF1 se evalúa la viabilidad celular sobre la línea celular MDCK de acuerdo a Liu et al. (2009), en este ensayo se obtiene la concentración de la viabilidad celular en un 50% denominada CC50, dicha concentración es de 0.8785 µg/ml. Una vez obtenida la concentración de CC50 se procede a evaluar la actividad antiviral, esta consiste en co-tratar a las partículas virales en la fracción MF1 en un periodo de una hora el cual dicho ensayo se denomina Co-tratamiento de acuerdo a la metodología establecida por He et al. (2011), dicho autor demuestra que el Co-tratamiento es un ensayo que permite evaluar si los extractos o fracciones evitan que los virus realicen la unión a los receptores de la superficie celular bloqueando a la hemaglutinina. Por lo que este análisis permite obtener la concentración de IC50 indicativo de la capacidad de la fracción MF1 para inhibir el 50% de partículas virales, dicha concentración es de 0.0274 µg/ml., logrando un índice de selectividad (SI=CC50/CE) de 32. Para comprobar que el mecanismo de acción de la fracción MF1 es a nivel de hemaglutinina se realiza la evaluación del efecto en la inhibición de la entrada del virus A/Yucatán/2370/09 en células MDCK infectadas a una MOI=0.01, co-tratadas con MF1 y 6'SLN.

De acuerdo a lo observado en la **Figura 1**, el objetivo del experimento fue determinar por medio de la observación de unidades formadoras de placas ocasionadas por la replicación de las partículas virales, poder predecir la unión virus células, esto por medio de los ensayos en placa. Por lo que se co-tratan los virus en presencia de la fracción MF1 o en su caso del glucopolímero 6'SLN (6-sialil-(N-acetilactosamina)) usado como control positivo pues inhibe la unión del virus a la célula bloqueando al sitio activo de la hemaglutinina de unión con el ácido siálico ($\alpha 2$, 6-SLN) debido a la gran afinidad que existe. Por medio de un ensayo en placa se determinó si existe disminución o inhibición de unidades formadoras de placas (UFP) a través del tiempo. Para este ensayo la fracción elegida fue MF1 debido a que obtuvo el índice de selectividad más alto (32), la concentración empleada fue de 0.8785µg/mL.

Los ensayos en placa se realizaron por duplicado, los resultados indican que la inhibición de la formación de unidades formadoras de placas es directamente proporcional al tiempo de co-tratamiento. A los 60 minutos se observó una inhibición del 100% tanto para la fracción como para el control 6'SLN, sin embargo es importante mencionar que la fracción MF1 inhibe la replicación viral desde los 15 minutos y el control 6'SLN inhibe la replicación viral a los 45 minutos, pero a los 15 y 30 minutos tenían un porcentaje de inhibición de 96.5 y 97.9% respectivamente, sin embargo no existe diferencia estadística significativa con un intervalo de confianza del 95% entre el control positivo y la fracción MF1. Por medio de este ensayo en placa se cuantificó la tasa de replicación de los virus de la influenza. De esta manera podemos asegurar que la fracción inhibe la entrada del virus al huésped como inhibidor a la unión de la hemaglutinina viral con el receptor de ácido siálico.

Así también se realiza un análisis molecular a través de la detección del Gen Np por medio de la técnica de qRT-PCR según WHO et al. (2009). A través de esta técnica se observa como la fracción MF1 es capaz de inhibir la replicación viral desde los 15 minutos de co-tratamiento, de esta manera se logra evidenciar el mecanismo de acción de la fracción MF1 a nivel de hemaglutinina (**Figura 2**).

De acuerdo a los datos experimentales obtenidos, antes expuestos, se determinó el mecanismo de acción de la fracción MF1. En primer instancia las partículas virales son co-tratadas con la fracción MF1, los metabolitos secundarios presentes en la fracción se unen al sitio activo de la hemaglutinina, por lo que al poner el virus en contacto con las células, estas partículas virales pasan desapercibido a los receptores celulares de la célula huésped debido a que el sitio activo de unión de la hemaglutinina con el ácido siálico ya se encuentra ocupado por la fracción MF1, por lo tanto no habrá infección y por ende replicación.

Finalmente se lleva a cabo un análisis metabolómico por medio de la técnica de UPLC-MS. Identificando cinco flavonoides tales como kaempferol (m/z: 286; TR: 8.9min), quercetina (m/z: 302; TR: 10.6min), isoquercetina (m/z: 464; TR: 9.8min), luteolina-5-glucosido (m/z: 448; TR: 6min) y rutina (m/z: 610; TR: 11.9min) quienes son los responsables de la actividad antiviral (**Figura 3**). De esta manera podemos decir que la planta medicinal *R. discolor* es un potencial inmunomodulador debido a que es capaz de prevenir la infección del virus de la influenza.

Los resultados se muestran en la **Tabla 1** y **2**

Tabla 1. Efecto antiviral de la fracción bioactiva de *Rhoeo discolor* contra el virus de la influenza A durante el co-tratamiento.

<i>Rhoeo discolor</i>		A/Yucatán/2370/09	
		MOI: 0.01	
Fracciones	CC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
MF1	0.8785 ± 0.018	0.0274 ± 0.071	32.0620

IC₅₀: Concentración inhibitoria media. IS: Índice de selectividad (IS: CC₅₀/IC₅₀). MOI: Multiplicidad Infecciosa. Los valores son la media ± SD de los resultados analizados de cada experimento por cuadruplicado.

Tabla 2. Número de copias del gen NP detectados por qRT-PCR en tiempo real de las muestras co-tratadas con 6'SLN y la fracción MF1

Tiempo (minutos)	N. de Copias 6'SLN	N. Copias MF1	% Inhibición 6'SLN	% Inhibición MF1	CV	CC
15	74.541	0	96.34	100	501.24	0
30	41.619	0	97.95	100	1021.65	0
45	0	0	100	100	1612.43	0
60	0	0	100	100	2035.80	0

6'SLN: 6-sialil-(N-acetilactosamina); MF1: Fracción proveniente del extracto metanólico de las hojas de la planta *Rhoeo discolor*; CV: Control viral; CC: Control celular.

Tabla 3. Compuestos identificados en el perfil metabolómico de la fracción MF1 por medio de la técnica de UPLC-MS.

Compuesto	m/z	TR (min)
Kaempferol	[286]	8.9
Quercetina	[302]	10.6
Isoquercetina	[464]	9.8
Rutina	[610]	11.9
Luteolina-7-glucosido	[448]	6

m/z= Relación masa carga; TR= Tiempo de retención

EJEMPLO 1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO

Se pesaron 20g del material vegetal *Rhoeo discolor* pulverizado y se colocaron en un matraz Erlenmeyer al cual se le adicionó 450 mL de metanol al 100%, esta mezcla fue sometida a sonicación en un
5 sonicador durante 2 h a temperatura ambiente, la mezcla obtenida se filtró y posteriormente se centrifugó en una centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se evaporó a vacío en un rotavapor a una temperatura de 45 °C y el residuo se resuspendió en 5 mL de metanol para su almacenamiento a -20°C (Chang & Chern, 2002).

EJEMPLO 2. OBTENCIÓN DE FRACCIONES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PREPARATIVA

En placas de gel de sílice 60 F₂₅₄, se colocó la muestra en una serie lineal con 5 µL de extracto por aplicación y se desarrolló en una cámara de saturación, saturada con el sistema de solventes cloroformo:
15 metanol: hidróxido de amonio (85:14:1), posteriormente los cromatofolios se dividieron en secciones y cada una de ellas fue raspada con un bisturí, el polvo obtenido de cada fracción se colocó en tubos con capacidad de 1.5 mL, se les adicionó 500 µL de metanol y se agitaron en un vortex durante 2 horas, una vez transcurrido el tiempo de agitación, las fracciones fueron centrifugadas en una microcentrífuga durante 5 min, el sobrenadante fue transferido a otro tubo y las fracciones obtenidas fueron almacenadas
20 a temperatura de -20°C y protegidas de la luz (Samoilova et al., 2011; Fowler et al., 2013).

EJEMPLO 3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

El análisis cualitativo se realizó a través de un análisis químico para detectar la presencia de las clases
25 principales de metabolitos secundarios, se determinó usando cromatografía en gel de sílice de capa fina (TLC) informado por Harbone, 1998. Brevemente, la cámara fue saturada con fase móvil formada por hexano: acetato de etilo: ácido acético (31: 14: 5). Después, las placas de fase estacionaria gel de sílice 60 F₂₅₄ 10X20cm base de aluminio se colocaron en la cámara. Metabolito: Estandar: Revelador

(flavonoides: quercetina: citrobórico reactivo; cumarínicos: umbeliferona: 5% de KOH en etano; saponina: diosgenina: 5% H₂SO₄ en metanol, Taninos: proantocianidinas: vainillina HCl al 5%). Por lo tanto, el componente se eludió durante 20 minutos y se observaron a través de una cámara de UV, 245 a 365 nm (cromato-Vue® C-75).

5

El análisis cuantitativo se realizó mediante métodos espectrofotométricos (Singleton 1999); que se hizo utilizando espectrofotómetro de luz visible. El contenido total de fenoles se estimó como equivalentes de ácido gálico (Singleton et al., 1999); contenido de saponinas se estimó como equivalentes diosgenina (Sim et al. 2012.); flavonas y flavonoles fueron estimados como equivalentes de quercetina (Chang et al. 2002) y el contenido de flavonoides totales se estimó como equivalentes de rutina (Robertson y Hall, 1989). Contenido de taninos se estimó como equivalentes de proantocianidinas (Sherman y Kowalska, 2008); Se estimó contenido de cumarina como equivalentes de umbeliferona (Wagner y Bladt, 1996).

10

EJEMPLO 4. LIOFILIZACIÓN DE LA FRACCIÓN MF1

15

Una vez obtenida los extractos y fracciones en solvente metanólicos según las metodologías antes expuestas, estos fueron colocados en baño María a 45°C hasta lograr la evaporación del metanol en un 99%, posteriormente el 1% restante se resuspendió en agua destilada para congelar la muestra y finalmente ser liofilizada en un liofilizador bajo una presión de 5 mm Hg a -50°C (Gulcin et al. 2010).

20

EJEMPLO 5. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA PARA EL ANALISIS UPLC-MS

20 mg de la muestra se resuspendió en 500 µL de disolvente (metanol absoluto) durante 10 minutos en baño de ultrasonido a temperatura ambiente. La muestra se filtró usando una membrana de Nylon de 0,2 micras y se sometieron a análisis UPLC-MS.

25

El análisis UPLC-MS de la muestra se llevó a cabo en un equipo HPLC-ESI-MS/MS system (LCQ Fleet Ion trap mass spectrometer, Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA), empleando como columna Hypersil gold C18 columna (50x2.1 mm, 1.9 µm tamaño de partícula). Usando como fase móvil H₂O con 0.1% (v/v) de ácido fórmico (solvente A); solvente B: metanol con 0.1%(v/v) de ácido fórmico. La columna opera a

una temperatura de 38°C, empleando un volumen de inyección de 10 µl, con una velocidad de flujo de 350 µl/min.

EJEMPLO 6. ENSAYO DE REDUCCIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO A NIVEL DE CO-TRATAMIENTO

5

Se sembraron células en placas de 96 pozos a una densidad celular de 1×10^5 células/pozo y se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ hasta alcanzar el 100% de confluencia celular, aproximadamente 24 h. Las células se lavaron dos veces con PBS pH 7.2 y fueron incubadas por 1 h en presencia de 120 µL por pozo de una mezcla virus-extracto, la cual fue previamente incubada durante 1 hora a temperatura ambiente. La suspensión de virus utilizada fue una dosis infecciosa o multiplicidad infectiva (MOI) de 0.01. Posteriormente se removió el D-MEM de las células y se lavaron dos veces con PBS, se agregó 120µL de la mezcla virus-fracción por cuadruplicado y se incubaron por 1 hora a 37°C con 5% de CO₂. Una vez transcurrido el tiempo se removió el inóculo y se agregó a las células medio D-MEM sin SFB adicionado con $1 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ de TPCK tripsina (tripsina tratada con L-(tosilamido-2-fenil-etil clorometil cetona). Las células se incubaron a 37 °C en presencia de CO₂ durante 72 horas, al finalizar el período de incubación se removió el medio de cultivo y las células fueron lavadas dos veces con PBS estéril y posteriormente teñidas con una solución de cristal violeta al 0.4 % en agua destilada. La reducción del efecto citopático se determinó como la última concentración del extracto que redujo en un 50% la actividad infecciosa del virus en las células MDCK (He et al. 2011).

15

20

EJEMPLO 7. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE UNIÓN DE ENTRADA EN CÉLULAS MDCK

El virus de la influenza inicia su infección con la unión de la HA al receptor de ácido siálico (SA) en la superficie de la célula huésped (Herrler et al. 1995). Por tal motivo fue empleado el glucopolímero 6'SLN (6-sialil-(N-acetilactosamina)) como control positivo de la unión específica HA-ácido siálico.

25

Las células MDCK se sembraron en placas de poliestireno de 12 pozos a una densidad de 1×10^6 células/pozo en medio DMEM con SFB al 10% e incubadas a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5% por 24 horas. Para determinar si los extractos y las fracciones tenían actividad al inhibir el proceso de unión y o de entrada del virus a la célula, las mezclas de virus-extracto y virus-glucopolímero se incubaron durante un tiempo máximo de 60 minutos. Se empleó la cepa A/Yucatán/2370/2009 (H1N1) con MOI 0.01. Para

determinar la concentración a la cual el extracto y el azúcar fueron capaces de inhibir completamente el virus, las células fueron infectadas con las mezclas respectivas de virus-extracto y/o virus glucopolímero cada 15 minutos hasta completar 60 minutos de infección que normalmente se lleva a cabo. Posterior al tiempo de una hora de infección se retiró el inoculo virus-extracto y virus-glucopolímero y se agregó medio de cultivo overlay suplementado con tripsina TPCK (1µg/mL) y agar al 3%. Las células se incubaron por 72 horas a 37°C con 5% de CO₂. Después de haber transcurrido las 72 horas el medio de cultivo con agar fue retirado de los pozos para teñir las células con cristal violeta al 0.4% para determinar el porcentaje de inhibición de los extractos y o el azúcar, se contaron las unidades formadoras de placas (UFP) en cada pozo y se compararon con un control de virus (Zhou et al. 2010).

EJEMPLO 8. EXTRACCIÓN DE RNA Y DETERMINACIÓN DEL GEN NP POR qRT-PCR TIEMPO REAL

Para la extracción del genoma del virus de la influenza, la cepa elegida para realizarlo fue A/Yucatán/2370/2009 (H1N1) ya que se evaluó en el ensayo de inhibición de entrada, de tal forma que el objetivo de este procedimiento fue determinar la presencia de replicación viral a través del tiempo aplicando el co-tratamiento. Para este fin es necesario la determinación del gen NP ya que aquellos virus que tienen éxito en la fusión con la HA y por consiguiente en la replicación, las ribonucleoproteínas (RNP) son liberadas posteriormente en el citoplasma. Las RPN son transportadas al núcleo, donde el complejo de la polimerasa se une al ARN viral (Kamps et al. 2010) debido a este motivo existe una gran cantidad del gen NP que pueden ser detectados a diferencia de otros genes.

Las células MDCK fueron sembradas a una densidad de 1×10^6 células/ pozo. Se realizó un ensayo similar descrito anteriormente, sin embargo para este caso se evaluó la MOI a 0.01 y la fracción identificada MF1 y el azúcar 6'SLN.

Una vez realizado el contratamiento las placas fueron incubadas a 37°C con atmosfera de 95% de humedad y 5% de CO₂ durante 24 horas. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS para que sean desprendidas con tripsina, y resuspendida en medio para su posterior uso.

Se realizó la extracción de RNA con el kit de extracción. El RNA fue recuperado y almacenado a -80°C hasta su posterior uso.

Para realizar qRT-PCR en tiempo real y la detección del gen NP del virus de la influenza, se utilizaron oligonucleótidos y sondas de hidrolisis que se encuentran doblemente marcados, estos están diseñados para la detección universal de virus de influenza de tipo A /H1N1pdm09.

Se empleó el kit de qRT-PCR cuantitativo de un solo paso, Invitrogen SuperScript™ III platinum one-Step

5 Quantitative, con los oligonucleótidos con secuencia forward 5'GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG 3'; revers 5'GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC3' y sonda 5'/ 56-FAM CYA CTG CAA GCC CA /BHQ_1DT/ (WHO et al. 2009).

Para la curva estándar, se utilizó el plásmido (pDrive Clonin vector QIAGEN) que contiene insertado el gen NP, de la cepa A/InDRE797/10.

REIVINDICACIONES

1. Una fracción bioactiva MF1 del extracto metanólico de las hojas de *Rhoeo discolor*,
caracterizada porque contiene cinco flavonoides: a) Kaemferol, b) Quercetina, c)
5 Isoquercetina, d) Rutina y e) Luteolina-7-glucósido.
2. Una fracción bioactiva MF1 del extracto metanólico de las hojas de *Rhoeo discolor* para usarse
en el tratamiento de la infección del virus de la influenza A, H1N1.
- 10 3. Una fracción bioactiva MF1 del extracto metanólico de las hojas de *Rhoeo discolor* de acuerdo
con la reivindicación 2, en donde dicha fracción bioactiva está a una concentración de al menos
0.0274 $\mu\text{g/mL}$ para ser usada.
4. Una fracción bioactiva MF1 del extracto metanólico de las hojas de *Rhoeo discolor* de acuerdo
15 con la reivindicación 2 y 3, en donde dicha fracción bioactiva actúa como bloqueador de la
hemaglutinina del virus de la influenza A, H1N1.
5. Uso de la fracción bioactiva MF1 del extracto metanólico de las hojas de *Rhoeo discolor* de
acuerdo con la reivindicación 1, para la preparación de una composición farmacéutica para el
20 tratamiento de la infección del virus de la influenza A, H1N1.

RESUMEN

La presente invención está relacionada con una fracción bioactiva del extracto metanólico de las
5 hojas de la planta *Rhoeo discolor* con actividad antiviral contra el virus de la influenza A,
H1N1. Esta invención está enfocada en el área farmacéutica para la fabricación de medicamentos
para el tratamiento de la infección causada por este virus, por lo que se especifica el método de
obtención de la fracción, el cual garantiza la presencia de los 5 flavonoides responsables de la
actividad anti-influenza, además se demostró que esta fracción bioactiva actúa a nivel de afectación
10 de la hemaglutinina, actualmente la FDA (Food and Drug Administration) aún no ha aprobado
ningún medicamento que actué a este nivel, por lo que la fracción MF1 representa una alternativa
viable según los datos experimentales obtenidos.

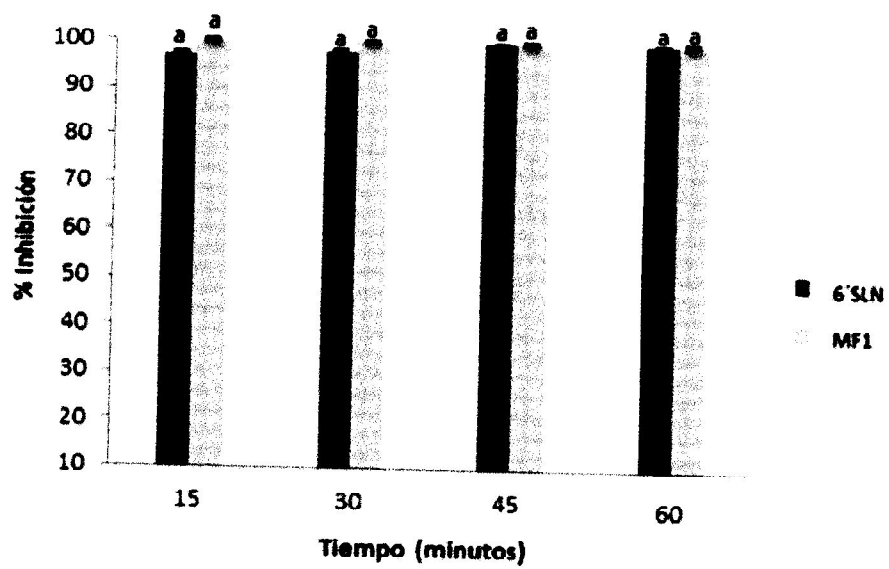
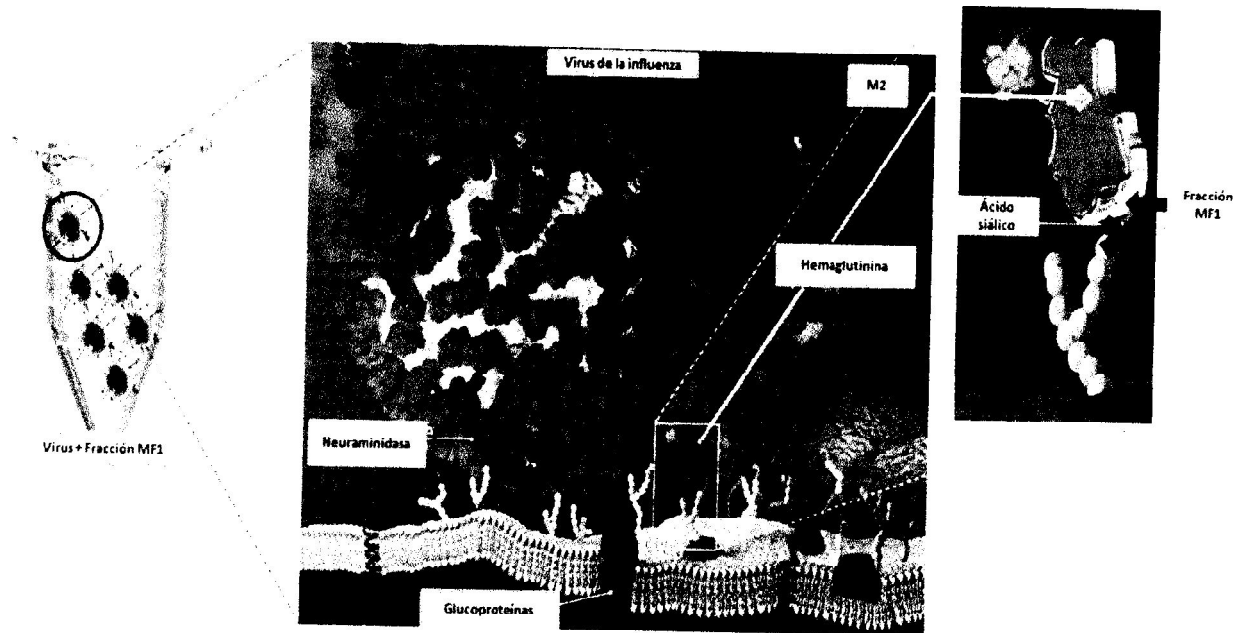


Figura 1.

**Figura 2.**

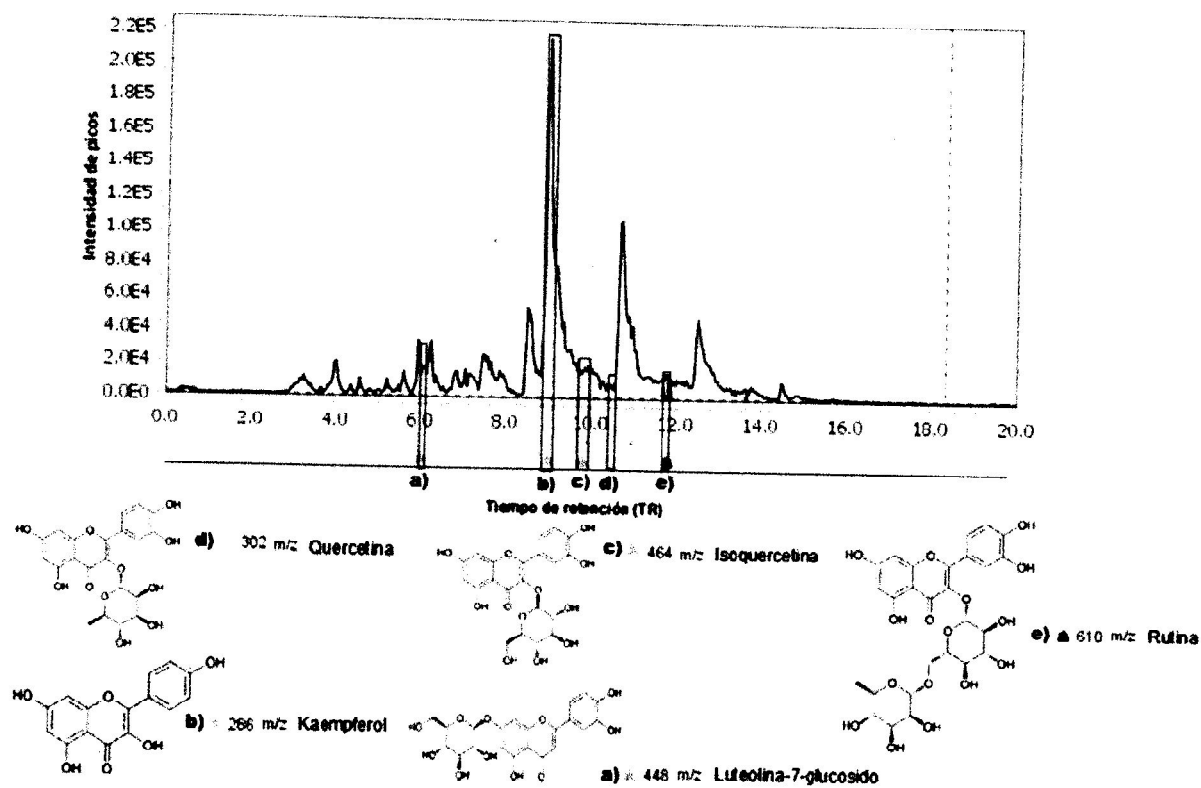


Figura 3.