

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 664 187**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2011 PCT/IB2011/052592**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12150486**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2011 E 11864742 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2704710**

(54) Título: **Una composición para tratar trastornos autoinmunitarios y métodos para ello**

(30) Prioridad:

02.05.2011 IN 1367MU2011

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.04.2018

(73) Titular/es:

INDUS BIOTECH PRIVATE LIMITED (100.0%)
1 Rahul Residency Plot No.6 & 7, Off Salunke
Vihar Road, Kondhwa
Pune 411 048, Maharashtra, IN

(72) Inventor/es:

**BHASKARAN, SUNIL y
VISHWARAMAN, MOHAN**

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 664 187 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

Una composición para tratar trastornos autoinmunitarios y métodos para ello

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a una composición que consiste en trigonósido Ib y vicenina-1 y al método para obtener dicha composición. La presente divulgación se refiere además a la aplicación de la composición para el tratamiento y manejo de trastornos autoinmunitarios tales como la enfermedad de Goodpasture, la glomerulonefritis, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la púrpura trombocitopénica idiopática.

Antecedentes y técnica anterior de la divulgación

Los trastornos autoinmunitarios como la enfermedad de Goodpasture, la glomerulonefritis, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la púrpura trombocitopénica idiopática demuestran una producción excesiva de autoanticuerpos que causan daño grave a las células, tejidos, órganos, etc. Estas enfermedades se caracterizan por la pérdida de tolerancia del cuerpo hacia los autoantígenos y posterior activación de las respuestas inmunitarias que conducen al daño tisular. La predisposición hereditaria y los factores ambientales son las causas predominantes de estas enfermedades.

La enfermedad de Goodpasture y la glomerulonefritis se caracterizan por la deposición de anticuerpos a lo largo de la membrana basal glomerular (GBM) en los riñones que da como resultado glomerulonefritis extracapilar. Estas enfermedades se denominan comúnmente enfermedades de la membrana basal anti-glomerular (anti-GBM). Los pacientes que padecen enfermedades anti-GBM tienen solo un 10 % de probabilidad de supervivencia renal. La enfermedad de Goodpasture es una enfermedad rara que ocurre en una de entre un millón de personas. El daño renal mediado por autoanticuerpos es la principal preocupación en la enfermedad de Goodpasture. Algunos pacientes también desarrollan hemorragia pulmonar, sin embargo, el daño causado a los pulmones por los anticuerpos anti-GBM no es permanente y rara vez mortal en comparación con el daño a los riñones.

El tratamiento existente para la enfermedad de Goodpasture o la glomerulonefritis incluye la plasmaféresis o el procedimiento de intercambio de plasma que elimina los anticuerpos anti-GBM circulantes de la sangre. El riesgo de exposición a hemoderivados, hematomas, reacciones a transfusiones y enfermedades transmitidas por transfusión son complicaciones importantes asociadas con la plasmaféresis. Otras opciones de tratamiento incluyen la administración de agentes inmunosupresores como corticosteroides y ciclofosfamida, que se prescriben para controlar la insuficiencia renal progresiva y la hemorragia en los pulmones. Estos fármacos suprimen la respuesta inmunitaria de forma no específica y aumentan las posibilidades de que los pacientes contraigan infecciones oportunistas. La línea actual de tratamiento para las enfermedades anti-GBM no controla completamente la enfermedad. La progresión de la enfermedad a la insuficiencia orgánica terminal aumenta el riesgo de mortalidad.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica y progresiva que afecta aproximadamente al 1 % de la población mundial y que está mediada por autoanticuerpos. De manera similar a la enfermedad de Goodpasture, la AR se caracteriza por la pérdida de la tolerancia del cuerpo hacia los autoantígenos y la posterior activación de las respuestas inmunitarias que conducen al daño tisular. La producción de autoanticuerpos dirigidos a la membrana sinovial, el cartílago y la articulación ósea subyacente define la patogénesis de la AR. La deformación de las articulaciones produce una discapacidad grave y una calidad de vida reducida. Los síntomas comunes incluyen dolor en las articulaciones, rigidez e hinchazón de las articulaciones, discapacidad motriz, debilidad muscular, fiebre y sensación general de malestar. El aumento de los niveles de proteína C reactiva y del factor reumatoide en la sangre son indicadores diagnósticos de la AR. El tratamiento existente para la AR incluye fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD) como hidroxicloroquina, inmunosupresores como azatiprina, corticosteroides, inhibidores selectivos de la COX-2, AINE y analgésicos para el alivio sintomático. El uso crónico de analgésicos, AINE, causan úlceras y tienen baja tolerancia en la mayoría de los pacientes y los inhibidores selectivos de la COX-2 se asocian con toxicidad cardíaca.

Los inmunosupresores son la principal línea de tratamiento para la AR. Como se discutió anteriormente, estos fármacos suprimen la respuesta inmunitaria de una manera no específica y aumentan las complicaciones potencialmente mortales. Los fármacos biológicos como los inhibidores del TNF, concretamente, adalimumab, etanercept, infliximab, etc., antagonistas de los receptores de IL-1, concretamente Anakinra y los antagonistas de los receptores de IL-6, concretamente, tocilizumab, se usan ampliamente en el tratamiento de la AR. Estos fármacos están diseñados para afectar las vías bioquímicas que causan la inflamación de las articulaciones y el daño articular al actuar como antagonistas de los receptores de citocinas. Una desventaja importante de los productos biológicos es la resistencia a estos fármacos por los pacientes y la disminución de la eficacia del tratamiento asociados a su uso crónico. Debido al perfil de toxicidad, muchos de estos fármacos se recomiendan solo para pacientes que no responden a otros tratamientos para la AR.

El lupus eritematoso sistémico (LES) es un trastorno autoinmunitario multisistémico que se diagnostica clínicamente en base a características como dolor en las articulaciones, fiebre, fatiga, lesiones cutáneas, fotosensibilidad, dolor

torácico, pérdida de cabello, llagas en la boca, etc., respaldado por hallazgos de autoanticuerpos en la sangre y proteína sérica excesiva en la orina. La insuficiencia renal es una de las principales complicaciones del LES. Más del 50 % de los pacientes con LES desarrollan insuficiencia renal debido a la deposición de anticuerpos en los glomérulos y requieren diálisis o trasplante renal. Otras complicaciones mediadas por autoanticuerpos incluyen daño a los pulmones, corazón, anemia hemolítica, trombocitopenia, disfunción cerebral, etc. Las opciones de tratamiento existentes para el LES incluyen AINES, agentes antipalúdicos, corticosteroides y metotrexato para aliviar las manifestaciones musculoesqueléticas y cutáneas. Según la USFDA, la línea actual de tratamiento para el LES presenta problemas como la enfermedad no controlada completamente, la progresión a la insuficiencia orgánica en estado terminal y los efectos secundarios debilitantes (Guía explicativa para la industria: Lupus eritematoso sistémico - Desarrollo de productos médicos para tratamiento, junio de 2010).

La púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) es un trastorno hemorrágico causado por una reducción drástica de las plaquetas. La PTI puede desencadenarse por infecciones, trastornos inmunitarios como el LES, ciertos fármacos, embarazo, etc. Aunque el mecanismo exacto de la patogénesis de la PTI aún no está claro, la PTI se atribuye en gran medida a la destrucción de plaquetas por anticuerpos antiplaquetarios ya que más del 50 % de los pacientes con PTI dan positivo para anticuerpos asociados a plaquetas (Gernsheimer, 2009). Las opciones de tratamiento existentes para la PTI incluyen (i) fármacos como corticosteroides e inmunoglobulina intravenosa que interfieren con la eliminación de las plaquetas recubiertas de anticuerpos; (ii) inmunosupresión de linfocitos T no específicos por fármacos como azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina; (iii) micofenolato mofetilo y productos biológicos como rituximab que interfieren con la síntesis de anticuerpos; (iv) procedimientos de esplenectomía y plasmaféresis que eliminan anticuerpos antiplaquetarios circulantes; (v) aumentar el recuento de plaquetas mediante transfusión de plaquetas y trasplante de médula ósea. Todas las opciones de tratamiento anteriores tienen efectos secundarios potenciales tales como la supresión de la inmunidad, la exposición a productos sanguíneos con riesgo de reacciones transfusionales y/o enfermedades transmitidas por transfusión y hematoma.

Con las deficiencias de las opciones de tratamiento existentes para los trastornos autoinmunitarios como la enfermedad de Goodpasture, la glomerulonefritis, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la púrpura trombocitopénica idiopática, etc., es esencial que las compañías farmacéuticas investiguen y desarrollen un tratamiento más efectivo con menores efectos secundarios para la resolución de estas enfermedades crónicas potencialmente mortales.

La patente US-6080401, Malireddy S. Reddy et al., describe el uso de una composición que consiste en mezclas de varias hierbas, una de las cuales es *Trigonella foenum-graecum*, junto con mezclas de varias preparaciones probióticas para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, concretamente, anemia, artritis, estreñimiento, depresión, diabetes, dispesia, hemorroides, hepatitis, hipertensión, impotencia, sobrepeso, enfermedad periodontal y combinaciones de las mismas.

La patente US-5707631, Chaim Lieberman, divulga la formulación de una composición a base de hierbas que consiste en *Trigonella foenum-graecum*, el fruto de *Syzygium aromaticum*, el bulbo de *Allium sativum*, la corteza de *Cinnamom zeylanicum*, la raíz de *Saussurea costus* y el brote de *Euphorbia lathyrus* para su uso en la reducción del colesterol, el tratamiento de la artritis, la presión arterial y la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, este documento de patente no divulga ninguna evidencia que pueda ser entendida y practicada por cualquier experto en la materia con respecto a cualquier acción de esta composición en la artritis en esta patente.

Subhashini et al., (2011) describe la actividad antioxidante de *Trigonella foenum-graecum* usando varios modelos *in vitro* y *ex vivo*.

Varjas et al. (2010) describe el efecto del fenogreco en la expresión génica de las enzimas metabolizadoras del ácido araquidónico.

Chopra et al., (2010) ha publicado recientemente una composición poli-herbal que comprende extracto de *Trigonella foenum-graecum* (fenogreco) junto con extractos de *Boswellia serrata* (Salai Guggul), *Linum usitatissimum* (semilla de lino), *Camellia sinensis* (té verde), *Curcuma longa* (cúrcuma), *Tribulus terrestris* (Gokshur) y *Piper nigrum* (pimienta negra) utilizado para el tratamiento de la AR.

Khan et al., (2011) evaluaron clínicamente una composición herbal que comprende *Nigella sativa*, *Withania somnifera*, *Smilax china*, *Apium graveolens*, *Trigonella foenum-graecum*, *Zingiber officinale* y *Colchicum autumnale* para el tratamiento de la artritis reumatoide

Toda la técnica anterior mencionada anteriormente describe una composición que consiste en varias hierbas y es difícil establecer que la *Trigonella foenum-graecum* esté contribuyendo a los efectos beneficiosos reivindicados.

Trigonella foenum-graecum o fenogreco se usa con mayor frecuencia en la medicina tradicional. Los extractos de semillas de fenogreco se investigan para el tratamiento de diversas enfermedades como diabetes, gota, úlceras estomacales, diarrea, estreñimiento, etc. Ahmadiani et al. (2001) estudiaron la actividad antiinflamatoria y antipirética del fenogreco. Vyas et al. (2008) mostraron que el extracto de semillas de fenogreco tiene actividades analgésicas y

antiinflamatorias. Estos estudios no ilustran ni enseñan componentes específicos o composición química en semillas de fenogreco que contribuyen a las actividades reivindicadas.

5 Las semillas de fenogreco están compuestas de muchas sustancias químicas, concretamente, alcaloides como trigonelina, gentianina, carpaína, colina; aminoácidos como 4-hidroxisoleucina, histidina, lisina, arginina; flavonoides - luteolina, quer cetina, vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina, vicenina-1, vicenina-2; saponinas de tipo furostanol - triogenelósido C, trigofenósidos, trigonósidos, fenugrina b; saponinas de tipo espirostanol - graecuninas, fenugreekina; sapinógenos - diosgenina, yamogenina, yuccagenina, lilagenina, tigogenina, neotigogenina, gitogenina, neogitogenina, sarsasapogenina, esmilagenina; antocianinas; fibra - goma; otros componentes fenólicos - trigocumarina, escopoletina, ácidos clorogénico, cafeico y *p*-cumárico; lípidos; vitaminas y restos de elementos inorgánicos.

10 El aspecto principal de la presente divulgación es una composición que comprende trigonósido Ib y vicenina-1 para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios tales como la enfermedad de Goodpasture, la glomerulonefritis y la artritis Reumatoide. La novedad y la actividad inventiva de esta divulgación reside en la composición única de trigonósido Ib y vicenina-1. El trigonósido Ib se ha descrito como una de las muchas saponinas de furostanol presentes en las semillas de fenogreco. La estructura del trigonósido Ib se muestra en la Figura 1. Yoshikawa et al. (1997) y Murakami et al. (2000) han caracterizado todos los trigonósidos presentes en el fenogreco y han proporcionado todos los datos de RMN de ¹³C, RMN de ¹H y [α]_D. La identificación del isómero específico se puede llevar a cabo usando hidrólisis ácida en la cual el trigonósido Ib da una neogitogenina, el trigonósido Ib da una gitogenina y el trigonósido Xlb da una L-ramnosa.

15 La semilla de fenogreco contiene muchos glucósidos flavonoides, concretamente, vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina, vicenina, etc. Estos flavonoides se han investigado para diversas actividades fisiológicas como 20 antioxidantes, antitiroideos, antiapoptóticos, antiinflamatorios, antinociceptivos, ansiolíticos, etc. La presente divulgación se refiere a uno de los glucósidos flavonoides vicenina-1. La presencia de vicenina-1 en el fenogreco ha sido descrita por Wagner et al. (1973). La estructura de vicenina-1 se muestra en la Figura 2. Otras especies de plantas que contienen vicenina-1 son *Linum usitatissimum*, *Tragopogon porrifolius* y *Triticum aestivum*. Sato et al. (2010) ha divulgado un método de síntesis de vicenina-1 y han proporcionado datos comparativos de la RMN de ¹³C para la vicenina-1 sintética y natural.

Declaración de la divulgación

25 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende trigonósido Ib y vicenina-1 opcionalmente junto con al menos un excipiente aceptable; un método para preparar una composición que comprende trigonósido Ib y vicenina-1 opcionalmente junto con al menos un excipiente, comprendiendo dicho método las acciones de: a) desmenuzar las semillas de *Trigonella*, b) extraer las semillas de *Trigonella* desmenuzadas con una mezcla de disolventes seguido de filtración y concentración para obtener una masa semisólida, c) disolver la masa para obtener una solución transparente, d) extraer a contracorriente la solución 30 transparente con n-butanol para obtener una solución que comprende una capa acuosa y una capa de butanol, e) pasar la capa acuosa a través de una resina de intercambio iónico y una columna adsorbente para obtener un eluyente que comprende el trigonósido Ib y la vicenina-1, f) purificar el eluyente para obtener un polvo fluido y g) opcionalmente añadir al menos un excipiente para obtener la composición; y un método para tratar trastornos autoinmunitarios, comprendiendo dicho método administrar una composición que comprende trigonósido Ib y vicenina-1 opcionalmente junto con al menos un excipiente, a un sujeto que lo necesite.

35 La invención proporciona una composición que consiste en trigonósido Ib y vicenina-1, opcionalmente junto con al menos un excipiente.

40 La invención proporciona además un método para preparar una composición que consiste en trigonósido Ib y vicenina-1, opcionalmente junto con al menos un excipiente, comprendiendo dicho método las acciones de:

45 a) desmenuzar las semillas de *Trigonella*,
 b) extraer las semillas de *Trigonella* desmenuzadas con una mezcla de disolventes seguido de filtración y concentración para obtener una masa semisólida,
 c) disolver la masa para obtener una solución transparente,
 d) extraer a contracorriente la solución transparente con n-butanol para obtener una solución que comprende una capa acuosa y una capa de butanol,
 e) pasar la capa acuosa a través de una resina de intercambio iónico y una columna adsorbente para obtener un eluyente que comprende el trigonósido Ib y la vicenina-1,
 f) purificar el eluyente para obtener un polvo fluido y
 g) opcionalmente añadir al menos un excipiente para obtener la composición.

50 Además, la invención proporciona una composición que consiste en trigonósido Ib y vicenina-1, opcionalmente junto con al menos un excipiente, para su uso en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios.

Breve descripción de las figuras adjuntas

- La **Figura 1** muestra la estructura del trigonósido Ib.
 La **Figura 2** muestra la estructura de la vicenina-1.
 5 La **Figura 3** muestra el cromatograma de HPLC del trigonósido Ib 46 % y la vicenina-1 6 %.
 La **Figura 4** muestra el cromatograma de HPLC del trigonósido Ib 76 % y la vicenina-1 15 %.
 La **Figura 5** muestra el cromatograma de HPLC del trigonósido Ib 91 % y la vicenina-1 5 %.
 La **Figura 6** muestra imágenes histopatológicas de riñón de ratas con glomerulonefritis inducida; (Derecha) Grupo de control de GBM; (Izquierda) GBM + composición de prueba (75 mg/kg) grupo; (1) Espacio de formación de orina, (2) Destrucción de glomérulos; (3) Tumefacción tubular; (4) Cilindros tubulares; (5) infiltración celular; (6) Reacción inmunológica a glomerulitis.

Descripción detallada de la divulgación

- 15 La presente divulgación se refiere a una composición que comprende trigonósido Ib y vicenina-1 opcionalmente junto con al menos un excipiente.
 En un aspecto de la presente divulgación, el trigonósido Ib varía en una concentración de aproximadamente 40 % (p/p) a aproximadamente 90 % (p/p) y la vicenina-1 varía en una concentración desde aproximadamente 1 % (p/p) a 20 aproximadamente 20 % (p/p).
 En otro aspecto de la presente divulgación, el trigonósido Ib y la vicenina-1 se obtienen de la planta *Trigonella foenum-graecum*.
 25 En otro aspecto más de la presente divulgación, el excipiente se selecciona de un grupo que comprende agentes de granulación, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes desgregantes, agentes edulcorantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes de recubrimiento, plastificantes, conservantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, material celulósico y agentes de esferonización o cualquier combinación de los mismos.
 30 En otro aspecto más de la presente divulgación, la composición se formula en formas farmacéuticas seleccionadas de un grupo que comprende comprimidos, cápsulas, trociscos, pastillas para chupar, polvos, jarabe, solución, aerosol, suspensión, polvos o gránulos dispersables, emulsión en cápsulas de gelatina duras o blandas, jarabes, elixires, linimentos, ungüentos, parches para la piel, fitocéuticos, nutracéuticos y productos alimenticios.
 35 La presente divulgación también se refiere a un método para preparar una composición que comprende trigonósido Ib y vicenina-1 opcionalmente junto con al menos un excipiente, comprendiendo dicho método una acción de:
 a) desmenuzar las semillas de *Trigonella*,
 40 b) extraer las semillas de *Trigonella* desmenuzadas con una mezcla de disolventes seguido de filtración y concentración para obtener una masa semisólida,
 c) disolver la masa para obtener una solución transparente,
 45 d) extraer a contracorriente la solución transparente con n-butanol para obtener una solución que comprende una capa acuosa y una capa de butanol,
 e) pasar la capa acuosa a través de una resina de intercambio iónico y una columna adsorbente para obtener un eluyente que comprende el trigonósido Ib y la vicenina-1,
 50 f) purificar el eluyente para obtener un polvo fluido y
 g) opcionalmente añadir al menos un excipiente para obtener la composición.
 55 En un aspecto de la presente divulgación, las semillas se desmenuzan hasta un tamaño que varía de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 5 mm, más particularmente 2 mm.
 En otro aspecto de la presente divulgación, la mezcla de disolventes comprende un alcohol alifático y agua en una relación de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 9:1 más particularmente 4:1.
 60 En otro aspecto más de la presente divulgación, el alcohol alifático se selecciona de un grupo que comprende alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol propílico y alcohol iso-propílico o cualquier combinación de los mismos.
 En otro aspecto más de la presente divulgación, la masa se disolvió en agua desionizada.
 65 En otro aspecto más de la presente divulgación, la purificación se lleva a cabo para obtener el trigonósido Ib que

tiene una pureza que varía de aproximadamente 90 % a aproximadamente 95 % y la vicenina 1 que tiene una pureza que varía de aproximadamente 90 % a aproximadamente 95 %.

- 5 En otro aspecto más de la presente divulgación, la purificación comprende las etapas de tratamiento con tampón seguido de tratamiento con alcohol o ácido y concentración para obtener polvo fluido purificado.
- En otro aspecto más de la presente divulgación, la concentración se lleva a cabo a una temperatura que varía de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C, más particularmente de aproximadamente 50 °C.
- 10 En otro aspecto más de la presente divulgación, la composición contiene trigonósido Ib en una concentración que varía de aproximadamente 40 % (p/p) a aproximadamente 90 % (p/p) y la concentración de vicenina-1 varía de aproximadamente 1 % (p/p) a aproximadamente 20 % (p/p).
- 15 En otro aspecto más de la presente divulgación, el excipiente se selecciona de un grupo que comprende agentes de granulación, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes disgragantes, agentes edulcorantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes de recubrimiento, plastificantes, conservantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, material celulósico y agentes de esferonización o cualquier combinación de los mismos.
- 20 La presente divulgación también se refiere a un método para tratar trastornos autoinmunitarios, comprendiendo dicho método las acciones de administrar una composición que comprende trigonósido Ib y vicenina-1 opcionalmente junto con al menos un excipiente, a un sujeto que lo necesita.
- En un aspecto de la presente divulgación, el trastorno autoinmunitario se selecciona de un grupo que comprende enfermedad de Goodpasture, glomerulonefritis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y púrpura trombocitopénica idiopática.
- 25 En otro aspecto de la presente divulgación, el sujeto es un animal o un ser humano.
- 30 En otro aspecto más de la presente divulgación, la composición se administra en una dosis diaria que varía de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg en animales y de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg en seres humanos.
- 35 La presente divulgación también se refiere al uso de una composición que comprende 40-90 % (p/p) de trigonósido Ib y 1-20 % (p/p) de vicenina-1 en el tratamiento de la enfermedad de Goodpasture, la glomerulonefritis, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la púrpura trombocitopénica idiopática mediante la prevención del daño en los órganos mediado por autoanticuerpos. El método para llegar a una composición específica que comprende trigonósido Ib y vicenina-1 de semillas de fenogreco no se conoce en la técnica. La singularidad del proceso divulgado en la presente divulgación reside en la extracción de una composición que comprende específicamente trigonósido Ib y vicenina-1. Se lleva a cabo una purificación adicional para obtener trigonósido Ib purificado al 90-95 % y vicenina-1 pura al 95 % para la caracterización estructural y la estandarización de la composición.
- 40 En otro aspecto de la presente divulgación, el trigonósido Ib tiene un peso molecular de 906 y una fórmula química de C₄₄H₇₄O₁₉.
- 45 En otro aspecto más de la presente divulgación, la vicenina-1 tiene un peso molecular de 564 y una fórmula química de C₂₆H₂₈O₁₄.
- En otro aspecto más de la presente divulgación, dicha composición se obtiene de la planta *Trigonella foenum-graecum*.
- 50 En otro aspecto de la presente divulgación, la composición está en una forma seleccionada de un grupo que comprende comprimidos, cápsulas, trociscos, pastillas para chupar, polvo, jarabe, solución, aerosol, suspensión, polvos o gránulos dispersables, emulsión en cápsulas de gelatina duras o blandas, jarabes, elixires, linimentos, ungüentos, parches para la piel, fitocéuticos, nutracéuticos y productos alimenticios.
- 55 La presente divulgación también se refiere a un proceso de extracción y purificación de la composición que comprende trigonósido Ib y vicenina-1 de *Trigonella foenum-graecum* y las etapas del proceso que comprenden lo siguiente:
- 60 a. Extraer la solución transparente mediante la eliminación de la grasa y eliminación de compuestos nitrogenados como alcaloides, aminoácidos; y
b. Pasar una solución transparente a través de una resina macroporosa de intercambio catiónico y una columna adsorbente para eluir el trigonósido Ib y la vicenina-1; concentración de eluyente y posterior purificación.
- 65 En un aspecto de la presente divulgación, la composición varía de 40-90 % (p/p) de trigonósido Ib y 1-20 % (p/p) de vicenina-1.

En otro aspecto de la presente divulgación, dado que el trigonósido Ib y la vicenina-1 se extraen de semillas de fenogreco, se da a entender que la composición puede comprender material celulósico que contiene moléculas inocuas de semilla de fenogreco en proporciones pequeñas como se ve a partir de los resultados de HPLC. (Figuras 3-5)

5 En otro aspecto de la presente divulgación, la extracción de una solución transparente de *Trigonella foenum-greacum* en la etapa (a) consiste en las siguientes etapas:

- i. desmenuzar las semillas de fenogreco;
- ii. extraer las semillas desmenuzadas con disolvente;
- 10 iii. filtrar el extracto para obtener una solución transparente;
- iv. concentrar la solución transparente al vacío para obtener una masa semisólida;
- v. disolver la masa concentrada para obtener una solución transparente;
- vi. extraer a contracorriente la solución transparente con n-butanol para eliminar la materia grasa.

15 En un aspecto de la presente divulgación, el disolvente utilizado en la etapa (b) es una mezcla de agua y alcohol seleccionada de un grupo que comprende alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol propílico y alcohol isopropílico, en una proporción que varía de 1: 1 a 9:1 y preferiblemente 4: 1.

20 En otro aspecto más de la presente divulgación, la extracción se lleva a cabo durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 8 horas a 12 horas y preferiblemente aproximadamente 10 horas.

En otro aspecto más de la presente divulgación, la extracción se lleva a cabo a una temperatura que varía de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C y preferiblemente a aproximadamente 35 °C.

25 En otro aspecto más de la presente divulgación, el extracto se concentra al vacío a una temperatura que varía de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 55 °C y preferiblemente de aproximadamente 50 °C.

En otro aspecto más de la presente divulgación, la masa concentrada se disuelve en agua desionizada.

30 En otro aspecto de la presente divulgación, la composición que comprende trigonósido Ib y vicenina-1 se obtiene a partir de la solución transparente de la etapa (b) usando las siguientes etapas:

- i. Pasar la capa de agua transparente a través de una resina macroporosa de intercambio catiónico y una columna adsorbente para eluir el trigonósido Ib y la vicenina-1;
- 35 ii. Concentración de eluyente y secado por pulverización.

En otro aspecto más de la presente divulgación, la columna adsorbente se selecciona de un grupo que comprende resina macroporosa ácida de intercambio catiónico, Sephadex LH-20, Dowex Optipore L493 o su equivalente.

40 En otro aspecto más de la presente divulgación, la elución de la columna adsorbente se lleva a cabo con agua y alcohol etílico con una relación inicial de 30:70 seguida de un cambio a una relación de 5:95.

En otro aspecto más de la presente divulgación, la elución de la columna adsorbente se lleva a cabo durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas, preferiblemente aproximadamente 2 horas.

45 En otro aspecto más de la presente divulgación, la masa concentrada se secó por pulverización de aproximadamente 110 °C a aproximadamente 130 °C, preferiblemente a aproximadamente 120 °C.

50 Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un proceso de purificación de trigonósido Ib y a las etapas del proceso que comprenden lo siguiente:

- i. disolver el eluyente concentrado en tampón y filtrar las sustancias insolubles;
- ii. lavar la solución tampón con n-butanol;
- iii. concentrar las fracciones de n-butanol;
- 55 iv. volver a disolver la fracción concentrada en disolvente; y
- v. pasar la solución resultante a través de la columna adsorbente.

En otro aspecto más de la presente divulgación, la solución tampón se selecciona de un grupo que comprende dihidrógenofosfato de potasio y ácido clorhídrico.

60 En otro aspecto más de la presente divulgación, el disolvente utilizado para la redisolución es alcohol etílico.

Otro aspecto más de la presente divulgación se refiere a un proceso de purificación de vicenina-1 a partir de una capa de n-butanol que comprende otros glucósidos flavonoides y las etapas del proceso que comprenden lo siguiente:

- i. concentrar a vacío;
 ii. lavar el concentrado con solución tampón para eliminar las sustancias insolubles;
 iii. concentrar la solución resultante a la mitad del volumen y agitar;
 iv. filtrar para eliminar cristales impuros; y
 5 v. calentar a reflujo los cristales impuros con disolvente y filtrar para obtener vicenina-1 pura al 95 %.

En otro aspecto más de la presente divulgación, la agitación de la masa concentrada se llevó a cabo durante 1 hora a 48 horas, preferiblemente 24 horas.

10 En otro aspecto más de la presente divulgación, la agitación de la masa concentrada se llevó a cabo de 30 °C a 40 °C, preferiblemente a 35 °C.

En otro aspecto más de la presente divulgación, el disolvente utilizado para el reflujo es metanol y dicloruro de metileno que varían en una relación de 1:1.

15 La presente divulgación también se refiere a un método para la fabricación de un medicamento que comprende una composición de 40-90 % (p/p) de trigonósido Ib y 1-20 % (p/p) de vicenina-1 opcionalmente junto con al menos un excipiente y un método para administrar una cantidad efectiva de la dicha composición para el tratamiento y manejo de enfermedades autoinmunitarias seleccionadas de un grupo que comprende enfermedad de Goodpasture, glomerulonefritis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y púrpura trombocitopénica idiopática.

20 La presente divulgación también se refiere a un método de tratamiento y manejo de enfermedades autoinmunitarias seleccionado de un grupo que comprende enfermedad de Goodpasture, glomerulonefritis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y púrpura trombocitopénica idiopática.

25 En un aspecto de la presente divulgación, el sujeto se selecciona de un grupo que comprende tanto animales como seres humanos.

30 La presente divulgación se elabora adicionalmente con la ayuda de los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1:

Se desmenuzaron 1000 g de semillas de fenogreco con un contenido de humedad inferior al 5 % en un molinillo de rodillos hasta un espesor de 2 mm. El material desmenuzado se extrajo en una mezcla de disolventes (8 litros) que comprendía alcohol etílico y agua en una proporción de 80:20 y se pasó a través de la capa durante un período de 10 horas a 40 °C reciclando el eluyente. Después de 10 horas, el extracto se filtró a través de una tela de malla 200 para obtener una solución transparente. La solución transparente se concentró hasta obtener una masa semisólida al vacío a 50 °C. La masa concentrada se disolvió en 5 litros de agua desionizada para obtener una solución transparente. La solución acuosa transparente se sometió a extracción a contracorriente con n-butanol. La capa de agua transparente se pasó a través de una columna que contenía 200 ml de resina macroporosa de intercambio catiónico de ácido fuerte durante 2 horas. El líquido transparente de salida de la columna carente de todos los aminoácidos, proteínas, trigonelina y otros compuestos anfóteros, se concentró a 50 °C y se secó por pulverización a 120 °C para obtener un polvo fluido que tenía una composición de aproximadamente 40-46 % (p/p) de trigonósido Ib y 1-6 % (p/p) de vicenina-1. La variación en el rango de la composición se atribuye a los cambios estacionales. El rendimiento fue de aproximadamente 60 g. El análisis de HPLC se llevó a cabo en las siguientes condiciones: Columna - 250 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro Kromasil C18 RP 5 µm; Fase móvil - Agua:gradiente de acetonaítrilo durante un período de 20 min a partir de 75:25 a 65:35; Caudal - 1 ml/min; Longitud de onda del detector: 210 nm UV. La salida de HPLC como se ve en la Figura 3 mostró el pico de trigonósido Ib a los 2,2 minutos y el pico de vicenina-1 a los 3,2 minutos. La composición se estableció mediante un método de estandarización externo usando muestras purificadas del trigonósido Ib obtenido del Ejemplo 4 y de la vicenina-1 del Ejemplo 5.

Ejemplo 2:

55 Se desmenuzaron 1000 g de semillas de fenogreco con un contenido de humedad inferior al 5 % en un molinillo de rodillos hasta un espesor de 2 mm. El material desmenuzado se extrajo en una mezcla de disolventes (8 litros) que comprendía alcohol isopropílico y agua en una proporción de 70:30 y se pasó a través de la capa durante un período de 10 horas a 35 °C reciclando el eluyente. Después de 10 horas, el extracto se filtró a través de una tela de malla 200 para obtener una solución transparente. La solución transparente se concentró hasta obtener una masa semisólida al vacío a 50 °C. La masa concentrada se disolvió en 5 litros de agua desionizada para obtener una solución transparente. La solución acuosa transparente se sometió a extracción a contracorriente con n-butanol. La capa de agua transparente se pasó a través de una columna que contenía 200 ml de resina macroporosa de intercambio catiónico de ácido fuerte durante 2 horas. El líquido transparente de salida de la columna carente de todos los aminoácidos, proteínas, trigonelina y otros compuestos anfóteros se pasó de nuevo a través de un lecho de resina que comprendía Dowex Optipore L493 o su equivalente durante un período de 2 horas y el proceso de adsorción se monitorizó mediante un sistema de cromatografía de capa fina que comprende tolueno:acetato de etilo:metanol:agua en una relación de 6:3:6:1. Los compuestos bioactivos monitorizados por el sistema

cromatográfico de capa fina comenzaron a eluirse cuando el proceso de elución usaba 95 % de alcohol etílico. Estas fracciones se recogieron, se cribaron y se agruparon y se concentraron desde 50 °C hasta 55-65 % (p/p) de trigonósido Ib y 8-12 % (p/p) de vicenina-1. La variación en el rango de la composición se atribuye a los cambios estacionales. El rendimiento fue de aproximadamente 15 g. El análisis de HPLC se llevó a cabo mediante el método descrito en el Ejemplo 1. La composición se estableció mediante un método de estandarización externo usando muestras purificadas del trigonósido Ib obtenido del Ejemplo 4 y de la vicenina-1 del Ejemplo 5.

Ejemplo 3:

- 10 Se desmenuzaron 1000 g de semillas de fenogreco con un contenido de humedad inferior al 5 % en un molinillo de rodillos hasta un espesor de 2 mm. El material desmenuzado se extrajo en una mezcla de disolventes (8 litros) que comprendía alcohol etílico y agua en una proporción de 80:20 y se pasó a través de la capa durante un período de 10 horas a 35 °C reciclando el eluyente. Después de 10 horas, el extracto se filtró a través de una tela de malla 200 para obtener una solución transparente. La solución transparente se concentró hasta obtener una masa semisólida al vacío a 50 °C. La masa concentrada se disolvió en 5 litros de agua desionizada para obtener una solución transparente. La solución acuosa transparente se sometió a extracción a contracorriente con n-butanol. La capa de agua transparente se pasó a través de una columna que contenía 200 ml de resina macroporosa de intercambio catiónico de ácido fuerte durante 2 horas. El líquido transparente de salida de la columna carente de todos los aminoácidos, proteínas, trigonelina y otros compuestos anfóteros se pasó de nuevo a través de un lecho de resina que comprendía Dowex Optipore L493 o su equivalente durante un período de 2 horas y el proceso de adsorción se monitorizó mediante un sistema de cromatografía de capa fina que comprende tolueno:acetato de etilo:metanol:agua en una relación de 6:3:6:1. Los compuestos bioactivos monitorizados por el sistema cromatográfico de capa fina comenzaron a eluirse cuando el proceso de elución usaba una mezcla de alcohol:agua. Estas fracciones se recogieron, se cribaron y se agruparon y se concentraron desde 50 °C hasta 70-76 % (p/p) de trigonósido Ib y 15-18 % (p/p) de vicenina-1. La variación en el rango de la composición se atribuye a los cambios estacionales. El rendimiento fue de aproximadamente 9 g. El análisis de HPLC se llevó a cabo mediante el método descrito en el Ejemplo 1 y el cromatograma resultante se muestra en la Figura 4. La composición se estableció mediante un método de estandarización externo usando muestras purificadas del trigonósido Ib obtenido del Ejemplo 4 y de la vicenina-1 del Ejemplo 5.
- 15 30 Los patrones puros de trigonósido Ib y vicenina-1 no están disponibles a través de los proveedores de patrones de referencia. Por lo tanto, a los efectos de la elucidación estructural y la estandarización de la composición, se llevaron a cabo el Ejemplo 4 y el Ejemplo 5 para aislar muestras purificadas de trigonósido Ib y vicenina-1, respectivamente.

Ejemplo 4:

- 35 Las composiciones del Ejemplo 1-3 se disolvieron en tampón de dihidrógenofosfato de potasio 50 mM 300 ml y las sustancias insolubles se filtraron. La solución tampón se lavó con n-butanol tres veces (75 ml x 3) y las tres fracciones se concentraron independientemente. Las fracciones 1, 2 y 3 mostraron una pureza del 85 %, 68 % y 40 % de trigonósido Ib, respectivamente. El trigonósido Ib en polvo al 85 % puro era aproximadamente 10 % del peso de partida que se redissolvió en alcohol etílico y se pasó a través de un lecho de Sephadex LH-20, volumen de lecho de 125 ml y las fracciones se recogieron y cribaron para detectar trigonósido Ib puro. La fracción de trigonósido Ib puro se concentró para obtener aproximadamente un 90-95 % de pureza de área que fue adecuada para la caracterización estructural. El rendimiento fue de aproximadamente 0,2 % del peso de partida del polvo blanquecino cristalino. El análisis por HPLC se llevó a cabo mediante el método descrito en el Ejemplo 1 y el cromatograma resultante se muestra en la Figura 5.

- 40 45 El punto de fusión fue 220 °C y el análisis LCMS confirmó la masa de 906 ($M+Na = 929$). La presencia de la estructura de saponina de furostanol se confirmó mediante cromatografía en capa fina (TLC) usando tolueno:acetato de etilo:metanol:agua en una proporción de 6:3:6:1, seguido de pulverización de anisaldehído y ácido sulfúrico al 5 % y calentando a 110 °C durante 15 min se mostró una mancha marrón verdosa. Análisis de RMN de ^{13}C en CD_3OD (100 MHz): δ_{C} (ppm) 44,43(C-1), 71,6(C-2), 85,8(C-3), 34,9(C-4), 44,4(C-5), 28,4(C-6), 30,78(C-7), 34,1(C-8), 51,7(C-9), 36,9(C-10), 22,0(C-11), 39,6(C-12), 41,8(C-13), 57,8(C-14), 32,8(C-15), 82,4(C-16), 65,06(C-17), 16,9(C-18), 12,08(C-19), 40,8(C-20), 16,3(C-21), 114,0(C-22), 38,5(C-23), 28,9(C-24), 34,9(C-25), 76,0(C-26), 17,6(C-27); **Glucosa-I:** 102,35(C-1'), 75,1(C-2'), 79,3(C-3'), 73,7(C-4'), 77,0(C-5'), 70,6(C-6'); **Xilosa:** 104,57(C-1"), 76,05(C-2"), 78,08(C-3"), 72,4(C-4"), 67,0(C-5"); **Glucosa-II:** 103,0(C-1"), 76,5(C-2"), 79,7(C-3"), 72,1(C-4"), 82,43(C-5"), 62,8(C-6"); Análisis de RMN de ^1H en CD_3OD : 0,744 (19-H₃), 0,869 (18-H₃), 0,959 (27-H₃), 1,05 (5-H), 1,51 (21-H₃), 2,06 (25-H), 2,206 (20-H), 3,48, 4,05 (26-H₂), 3,699 (3-H), 4,14 (2-H), 4,04, 5,1 (6'-H₂); $[\alpha]_D^{24}$ ($c=0,37$, Piridina): -41,9°.

Ejemplo 5:

- 50 65 Aproximadamente 8000 ml de capa de n-butanol que comprende otros glucósidos flavonoides de los ejemplos 1-3 se concentraron a 50 °C usando un evaporador de vacío a 400 ml. Esta solución se lavó dos veces con una solución de dihidrógenofosfato potásico 50 mM seguido de 500 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico al 1 %. En esta etapa, las sustancias insolubles sedimentan en forma de polvo amarillo amorfo. La solución anterior se concentró a

la mitad del volumen y se agitó durante 24 horas a entre 30 y 35 °C para permitir la sedimentación y filtración de más cristales de otros glucósidos flavonoides filtraran. Estos cristales impuros se calentaron a reflujo en una mezcla de metanol y dícloruro de metileno 1:1 a 15 °C durante 3 horas y se filtraron a 5 °C para obtener vicenina-1 pura al 95 %. El rendimiento fue de aproximadamente 1,8 g.

5 El punto de fusión fue 215 °C con descomposición y el análisis LCMS confirmó la masa de 564 ($M+H = 565$). La presencia de la estructura del glicósido flavonoide se confirmó mediante cromatografía en capa fina (TLC) usando tolueno:acetato de etilo:metanol:agua en una proporción de 6:3:6:1, seguido de pulverización de ácido sulfúrico metanólico al 5 % y calentando a 110°C durante 15 minutos se mostró una sola mancha amarilla. Análisis de RMN de ^{13}C en CD_3OD (100 Mhz): δ_{C} (ppm) 164,57(C-2), 103,05(C-3), 182,7(C-4), 161,4(C-5), 108,55(C-6), 158,7(C-7), 104,1(C-8), 155,5(C-9), 103,1(C-10), 122,0(C-1), 129,2(C-2'), 116,45(C-3'), 161,6(C-4'), 116,29(C-5'), 129,1(C-6'); **Xilosa:** 74,6(C-1"), 70,5(C-2"), 79,3(C-3"), 70,7(C-4"), 68,9(C-5"); **Glucosa:** 71,76(C-1"), 70,99(C-2"), 79,67(C-3"), 70,05(C-4"), 82,35(C-5"); 61,6(C-6"); Análisis de RMN de ^1H en DMSO-d_6 (a 25 °C): protón aromático correspondiente al anillo de protones de flavona - [6,79, 6,8; 7,936, 7,949; 6,897, 6,951; 8,0, 8,031], protones de azúcar - 6-C-xilosido entre 3,09 y 4,65 y 8-C-glucósido entre 3,29 y 4,77.

Ejemplo 6:

20 En un aspecto de la presente divulgación, se mezclaron 1 g de trigonósido Ib 76 % y vicenina-1 15 % con 14 g de trigonósido Ib 91 % y vicenina-1 5 % para obtener una composición que comprende 15 g de trigonósido Ib 90 % y vicenina-1 5,7 %. Este ejemplo demuestra el método para llegar al rango de la composición deseado que comprende 40-90 % (p/p) de trigonósido Ib y 1-20 % (p/p) de vicenina-1 mezclando diferentes composiciones que tienen concentraciones variadas de dichos componentes. Un experto en la materia entenderá que la composición obtenida en la presente memoria se puede obtener mezclando los componentes trigonósido Ib y vicenina-1, disponibles por extracción de fuentes vegetales u obtenidos por síntesis química de dichos componentes. Por lo tanto, el fenogreco no es la única fuente para llegar a dicha composición. Se puede obtener mezclando los componentes sintetizados trigonósido Ib y vicenina-1.

30 Además, la composición también se puede obtener mezclando los componentes, trigonósido Ib y vicenina-1, como se obtienen en los ejemplos descritos en la presente divulgación.

La composición de prueba que comprende 40-90 % (p/p) de trigonósido Ib y 1-20 % (p/p) de vicenina-1 obtenidos a partir de los métodos especificados en los Ejemplos anteriores se probaron adicionalmente para determinar la actividad fisiológica en los siguientes ejemplos:

35 **Ejemplo 7: Actividad en glomerulonefritis inducida en ratas**

La glomerulonefritis es una causa importante de insuficiencia renal y muerte en enfermedades autoinmunitarias como la enfermedad de Goodpasture. Este estudio se realizó para examinar el efecto de la composición de prueba que comprende trigonósido Ib 76 % (p/p) y vicenina-1 15 % (p/p) en modelo de rata de glomerulonefritis crescéntrica inducida por anti-GBM.

40 Ratas Wistar machos que pesaban 180-220 g se dividieron en grupos de 6 animales cada uno. La glomerulonefritis fue inducida según lo especificado por Chen et al., (2004) mediante una primera administración subcutánea de IgG de rata (5 mg) en adyuvante completo de Freund (FCA) seguido de administración de GBM (0,5 ml) por vía intravenosa después de 5 días. Los animales en el grupo de tratamiento recibieron la composición de prueba (75 mg/kg) por vía oral dos veces al día durante 28 días. Los animales en el grupo de control de GBM no recibieron ningún tratamiento. Un tercer grupo de animales sin inducción de glomerulonefritis y tratamiento se mantuvo como control normal. La producción de orina se midió y analizó antes de la inducción de la glomerulonefritis y después de la finalización del tratamiento. El día 28, los animales fueron sacrificados para el examen histopatológico de sus riñones y pulmones.

TABLA 1: EFECTO SOBRE LA EXCRECIÓN DE PROTEÍNAS EN ORINA POR DÍA EN RATAS CON GLOMERULONEFRITIS INDUCIDA (en mg/día, MEDIA ± EEM)

Período de tratamiento	Control normal	Control GBM	GBM + Composición de prueba (75 mg/kg)
Momento basal	6,08±1,34	8,18±0,46	5,55±0,48
Día 28	5,48±1,1	20,35±2,66***	7,11±0,62***

n = 5; Los datos se analizaron mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba post-Bonferroni; ***P <0,001 en comparación con el grupo de control normal para los días respectivos; ***P<0,001 en comparación con el grupo de control GBM para los días respectivos.

55 Las proteínas en orina excretadas por día (mg/día) por los animales en el grupo de control GBM el día 28 se incrementó más de tres veces respecto al valor basal. El aumento de la excreción de proteínas en la orina es un indicador de función renal reducida. El tratamiento con el fármaco de prueba normalizó completamente la excreción de proteínas en la orina, manteniéndola cerca del valor basal.

TABLA 2: EXAMEN HISTOPATOLÓGICO DE LOS RIÑONES EL DÍA 28

Parámetros	Control normal	Control GBM	GBM + composición de prueba (75 mg/kg)
Destrucción de glomérulos	--	+++	+
Tumefacción tubular	--	+++	+
Cilindros tubulares	--	+++	--
Infiltración celular	--	+++	+

Clasificación patológica: Grave (+++); Moderado (++) ; Leve (+); Ausencia (-).

Las imágenes de la histopatología renal de las ratas con glomerulonefritis inducida se muestran en la Figura 6. Los animales tratados con la composición de prueba mostraron ausencia de cilindros tubulares junto con una destrucción significativamente menor de los glomérulos, tumefacción tubular e infiltración celular, en comparación con el grupo de control GBM. Por lo tanto, las condiciones patológicas se redujeron significativamente mediante el tratamiento con la composición de prueba.

TABLA 3: EXAMEN HISTOPATOLÓGICO DE LOS PULMONES EL DÍA 28

Parámetros	Control normal	Control GBM	GBM + composición de prueba (75 mg/kg)
Engrosamiento del intersticio	--	+++	+
Infiltración de linfocitos, macrófagos y monocitos en el intersticio	--	+++	+
Extravasación de eritrocitos en el intersticio	--	+++	--
Engrosamiento de las paredes alveolares	--	++	+
Aumento de la longitud del cordón septal alveolar	--	++	--

Clasificación patológica: Grave (+++); Moderado (++) ; Leve (+); Ausencia (-).

10 También se examinaron los efectos patológicos de los anticuerpos anti-GBM en la membrana basal alveolar de los pulmones. El examen histopatológico de los pulmones de los animales del grupo de control GBM mostró un grosor de la pared alveolar notablemente aumentado, un aumento de la longitud del cordón septal alveolar junto con un intersticio pulmonar engrosado, inflamación intensa como se evidencia por la infiltración de linfocitos, macrófagos y monocitos en el intersticio y extravasación prominente de eritrocitos en el intersticio. Los animales tratados con la composición de prueba mostraron una reducción significativa en todas las afecciones patológicas anteriores que indican actividad beneficiosa de la composición de prueba para prevenir el daño pulmonar por anticuerpos.

15 20 25

15 20 25 La composición de prueba redujo efectivamente el daño a los riñones y los pulmones inducido por anticuerpos anti-GBM que confirmaban la actividad en la enfermedad de Goodpasture que se caracteriza por pacientes que sufren tanto de glomerulonefritis como de hemorragia pulmonar. Por lo tanto, la composición de prueba es útil en el tratamiento de enfermedades anti-GBM como la glomerulonefritis, enfermedad de Goodpasture, etc.

Ejemplo 8: Actividad antiinflamatoria de la composición de prueba

25 30 Esta prueba se realizó para evaluar la actividad de la composición de prueba que comprende trigonósido Ib 65 % (p/p) y vicenina-1 10 % (p/p), para inhibir la inflamación causada por las prostaglandinas. Ratas wistar macho que pesaban 180-220 g se pretrataron con la composición de prueba. Una hora después del pretratamiento, se administró una inyección subplantar de 0,1 ml de solución de carragenano a la pata trasera derecha. El edema de pata inducido se midió usando un pleitismómetro (UGO Basile 7140). La inhibición del edema de la pata a las 3 horas muestra la acción antiinflamatoria.

35 La inhibición del edema de la pata se calculó como una diferencia porcentual en el valor medio del volumen de la pata en el grupo de control con respecto al del grupo tratado con la composición de prueba. El edema de la pata inducido por carragenano se redujo significativamente por la composición de prueba después de la 2^a y 3^a hora.

TABLA 4: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL EDEMA DE LA PATA INDUCIDO POR CARRAGENANO

Tiempo después de la inyección de carragenano	Dosis	% de inhibición del edema de la pata después de 2 horas	% de inhibición del edema de la pata después de 3 horas
Control normal	-	-	-
Composición de prueba	5 mg/kg	41,56*	40,49***
	10 mg/kg	49,74**	36,05**
	25 mg/kg	77,76***	63,72***

n = 6; Los datos se analizaron mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba post-Bonferroni; *** P <0,001, **P<0,01 y * P<0,05 en comparación con el grupo de control normal para las horas respectivas.

Ejemplo 9: Inhibición de citocinas in vitro de la composición de prueba

El lipopolisacárido (LPS) es un componente de las bacterias gramnegativas que puede inducir la sobreproducción de óxido nítrico, que a su vez estimula la secreción de citocinas. Se estimuló el sistema de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana usando LPS para la expresión de IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Se probó la actividad de la composición de prueba para inhibir la liberación de estas citocinas proinflamatorias. Las composiciones de prueba mostraron una actividad inhibidora significativa contra la secreción de citocina proinflamatoria.

TABLA 5: VALOR CE₅₀ DE INHIBICIÓN DE LA CITOQUINA (μ g/ml)

	Composición de prueba que comprende trigonósido Ib 76 % y vicenina-1 15 %	Composición de prueba que comprende trigonósido Ib 46 % y vicenina-1 5 %
IL-1 β	94	211
IL-6	95	42
TNF- α	58	133

Ejemplo 10: Acción antiartrítica de la composición de prueba

La actividad antiartrítica se estudió inyectando el adyuvante completo de Freund (FCA) en la pata de la rata y midiendo la formación de edema y el porcentaje de inhibición del volumen de la pata en la pata no inyectada.

Se inyectó a ratas Wistar macho que pesaban 190-250 g 0,1 ml de FCA en la región subplantar de la pata trasera izquierda. Se suspendió 0,1 ml de solución de FCA que consisten en 6 mg de Fracción Completa de *Mycobacterium butyricum* (Difco) en aceite de parafina pesado (Merck). Después de algunas horas se produjo edema local. El tratamiento con el compuesto de prueba se llevó a cabo desde el día 13 hasta el día 21 después de la inyección de FCA. El volumen de la pata trasera no inyectada se registró usando un pleitómetro (UGO Basile 7140).

El porcentaje de inhibición de la inflamación en la pata no inyectada se midió como la diferencia en el volumen medio de la pata del grupo control de FCA con respecto a la de los animales tratados. Se observó una reducción significativa del hinchamiento de la articulación inducida por FCA tanto a los 5 días (día 18) como a los 8 días (día 21) después del tratamiento inicial con la composición de ensayo. La composición de prueba mostró una reducción de casi el 80 % de la artritis.

TABLA 6: REDUCCIÓN DEL PORCENTAJE DE ARTRITIS INDUCIDA POR FCA

Grupos de tratamiento	Dosis	Día 18	Día 21
Control normal	-	-	-
Celecoxib	10 mg/kg	58,97±35,93***	81,24±22,35***
Composición de prueba que comprende trigonósido Ib 46 % y vicenina-1 5 %	50 mg/kg	19,78±45,01	41,63±18,64
	100 mg/kg	9,06±32,89	78,47±22,55***
	200 mg/kg	17,93±44,05	39,81±18,76
Composición de prueba que comprende trigonósido Ib 76 % y vicenina-1 15 %	10 mg/kg	53,86±8,8***	49,27±8,69***
	25 mg/kg	49,36±12,27***	57,59±9,37***
	50 mg/kg	57,56±10,12***	80,25±10,59***

n = 6; Los datos se analizaron mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba post-Bonferroni; ##P<0,01 en comparación con el grupo de control normal para los días respectivos. ***P <0,001 en comparación con el grupo control FCA para los días respectivos.

Ejemplo 11: Estudio anecdótico de la composición de prueba en pacientes con artritis reumatoide

Se realizó un estudio prospectivo en 5 pacientes con artritis reumatoide (AR) con edades comprendidas entre 45 y 60 años. A los pacientes se les administraron cápsulas de la composición de prueba a una dosis de 500 mg dos veces al día durante un período de 1 año y se analizó la eficacia de la composición de prueba en base al resultado comunicado por el paciente en un Cuestionario de Evaluación de Salud (HAQ) publicado por Kumar et al., (Rheumatology, Vol. 41, pp.1457-1459, 2002).

TABLA 7: CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN DE LA SALUD COMUNICADA POR EL PACIENTE PARA LA ARTRITIS REUMATOIDE

Actividad de la vida diaria	Paciente 1		Paciente 2		Paciente 3		Paciente 4		Paciente 5	
	Antes	Después								
Vestirse solo, ponerse el	1	0	2	1	3	1	3	2	2	1

Actividad de	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5
sari, salwar, dhoti, pijama y abrocharse los botones					
Acostarse y levantarse de la cama	1	0	3	2	3
Levantar una taza o vaso lleno hasta la boca	1	0	2	1	2
Caminar al aire libre en un terreno llano	1	0	2	1	3
Lavar y secarse todo el cuerpo	1	0	2	1	3
Ponerse en cuclillas en el inodoro o sentarse con las piernas cruzadas en el suelo	2	1	3	2	3
Inclinarse para coger la ropa del suelo	2	1	3	2	3
Abrir y cerrar un grifo	1	0	2	1	3
Entrar y salir de un bici-taxi o coche	1	1	3	2	3
Caminar tres kilómetros	2	1	3	2	3
Comprar en un mercado de verduras	0	0	1	1	3
Subir un tramo de escaleras	2	1	3	2	3
Puntuación de discapacidad	1,25	0,42	2,42	1,58	2,75
Puntuación (0-3): 0 - Sin ninguna dificultad; 1 - Con alguna dificultad; 2 - Con mucha dificultad; 3 – Incapaz de hacer. Puntuación de discapacidad calculada como la suma de todas las puntuaciones dividido por 12.					

La puntuación de la evaluación de la salud individual de los pacientes del estudio anecdotico antes del comienzo del tratamiento con la composición de prueba y después de 1 año de tratamiento se presentan en la Tabla 7. La puntuación de discapacidad se calculó como la suma de todas las puntuaciones divididas por 12. Todos los pacientes mostraron mejoría en la puntuación de discapacidad.

Al inicio del estudio, 4 de cada 5 pacientes tenían un rango de puntuación de discapacidad grave de 2 a 3. Despues de 12 meses de tratamiento con la composición de prueba, solo 1 de cada 5 pacientes permaneció en el rango de puntuación de discapacidad grave de 2 a 3. Se observó una mejoría significativa en las actividades diarias y el cumplimiento de los pacientes fue más del 90 % de la composición de prueba. Por lo tanto, se encontró que la composición de prueba era segura y útil en el tratamiento de pacientes diagnosticados con artritis reumatoide.

Ejemplo 12: Formulación de la composición de prueba

Las cápsulas del Ejemplo 11 se prepararon por granulación de la composición de prueba que comprendía trigonósido Ib 76 % (p/p) y vicenina-1 15 % (p/p) por mezcla con 1,5 % p/p de celulosa microcristalina, 1 % p/p de disgregante de almidón pregelatinizado, 0,5 % p/p de crospovidona y 0,5 % p/p de antiadherente estearato de magnesio. El granulado mezclado se llenó en las cápsulas.

Una formulación similar de la composición de prueba que varía de 40 a 90 % (p/p) de trigonósido Ib y de 1 a 20 % (p/p) de vicenina-1 se puede preparar mediante la adición de excipientes seleccionados de una lista que comprende los siguientes: agentes de granulación, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes disgregantes, agentes edulcorantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes de recubrimiento, plastificantes, conservantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, agentes de esferonización y cualquier combinación de los mismos. Y el tipo de formulación se puede seleccionar de un grupo que consiste en comprimidos, cápsulas, trociscos, pastillas para chupar, polvo, jarabe, solución, aerosol, suspensión, polvos o gránulos dispersables, emulsión en cápsulas de gelatina dura o blanda, jarabes, elixires, linimentos, ungüentos, parches para la piel, fitocéuticos, nutracéuticos y productos alimentos. Dependiendo de la vía de administración, se pueden usar diferentes excipientes/vehículos. Los expertos en la materia pueden elegir una formulación adecuada de la composición de prueba para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, concretamente, la enfermedad de Goodpasture, la glomerulonefritis, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la púrpura trombocitopénica idiopática.

Ejemplo 13: Estudio anecdótico en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES)

Se realizó un estudio prospectivo en 3 pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (LES) con una edad comprendida entre 35 y 50 años durante un período de 6 meses. La formulación de la composición de prueba como se describe en el ejemplo 12 se administró a una dosis de dos cápsulas de 500 mg dos veces al día. La actividad de la composición de prueba se controló mediante el seguimiento de los parámetros de laboratorio y el índice de actividad diaria.

El tratamiento con la composición de prueba mejoró significativamente la función renal, los parámetros sanguíneos junto con la reducción del dolor articular, la alopecia, las erupciones cutáneas y las úlceras bucales. Estos resultados fueron respaldados por una mejora en las puntuaciones del Índice de Actividad Diaria (SLEDAI) de LES de 20 al comienzo del tratamiento a 10 al final del tratamiento para el paciente 1. Se observó una mejoría similar para el paciente 2 de 10 a 6 y el paciente 3 de 12 a 8 después de 6 meses de tratamiento. Por lo tanto, se encontró que la composición de prueba era útil en el tratamiento y manejo del LES.

Ejemplo 14: Actividad de la composición de prueba frente a la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI)

Se verificó que los ratones Balb-c tenían un recuento de plaquetas inicial dentro de los límites fisiológicos y se dividieron en 3 grupos. La púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) se indujo por inyección intraperitoneal de 4 µg de anticuerpos anti-integrina α_{IIb} de ratón a animales del grupo de control de PTI y en el grupo de tratamiento con la composición de prueba. Los animales del grupo de tratamiento recibieron 75 mg/kg de composición de ensayo que comprende trigonósido Ib 76 % (p/p) y vicenina-1 15 % (p/p) una hora antes de la inducción de la PTI. En los animales del grupo de control normal no se indujo la PTI ni recibieron ningún tratamiento. Tres horas después de la inducción de la PTI, se extrajo sangre de los animales en todos los grupos para analizar el recuento de plaquetas.

TABLA 8: EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA PRUEBA EN EL RECUENTO DE PLAQUETAS

Grupo de tratamiento	Porcentaje de reducción en el recuento de plaquetas
Control normal	22 %
Control de PTI	60 %
Composición de prueba (75 mg/kg) + PTI	16,5 %

Los animales tratados con la composición de prueba mostraron una reducción plaquetaria significativamente menor del 16,5 % solo en comparación con el 60 % en los animales de control de PTI después de la administración de anticuerpos antiplaquetarios. Los animales de control normal también mostraron una reducción de plaquetas del 22 %. Esta reducción se atribuyó a la posterior extracción de sangre para analizar el recuento de plaquetas.

El ejemplo anterior demuestra que la composición de prueba es eficaz contra la reducción mediada por anticuerpos del recuento de plaquetas y, por lo tanto, es útil en el tratamiento y manejo de la PTI y/o de la trombocitopenia.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que consiste en trigonósido Ib y vicenina-1, opcionalmente junto con al menos un excipiente.
- 5 2. La composición según la reivindicación 1, en la que el trigonósido Ib varía en una concentración de 40 % (p/p) a 90 % (p/p) y la vicenina-1 varía en una concentración de 1 % (p/p) a 20 % (p/p) y el trigonósido Ib y la vicenina-1 se obtienen de la planta *Trigonella foenum-graecum*.
- 10 3. La composición según la reivindicación 1, en la que el excipiente se selecciona de un grupo que comprende agentes de granulación, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes disgregantes, agentes edulcorantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes de recubrimiento, plastificantes, conservantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, material celulósico y agentes de esferonización o cualquier combinación de los mismos.
- 15 4. La composición según la reivindicación 1, en la que la composición se formula en formas farmacéuticas seleccionadas de un grupo que comprende comprimidos, cápsulas, trociscos, pastillas para chupar, polvo, jarabe, solución, aerosol, suspensión, polvos o gránulos dispersables, emulsión en cápsulas de gelatina duras o blandas, jarabes, elixires, linimentos, ungüentos, parches para la piel, fitocéuticos, nutracéuticos y productos alimenticios.
- 20 5. Un método para preparar una composición que consiste en trigonósido Ib y vicenina-1, opcionalmente junto con al menos un excipiente, comprendiendo dicho método las acciones de:
 - a) desmenuzar las semillas de *Trigonella*,
 - b) extraer las semillas de *Trigonella* desmenuzadas con una mezcla de disolventes seguido de filtración y concentración para obtener una masa semisólida,
 - c) disolver la masa para obtener una solución transparente,
 - d) extraer a contracorriente la solución transparente con n-butanol para obtener una solución que comprende una capa acuosa y una capa de butanol,
 - e) pasar la capa acuosa a través de una resina de intercambio iónico y una columna adsorbente para obtener un eluyente que comprende el trigonósido Ib y la vicenina-1,
 - f) purificar el eluyente para obtener un polvo fluido y
 - g) opcionalmente añadir al menos un excipiente para obtener la composición.
- 35 6. El método según la reivindicación 5, en el que las semillas se desmenuzan hasta un tamaño que varía de 1 mm a 5 mm, preferiblemente 2 mm.
7. El método según la reivindicación 5, en el que la mezcla de disolventes comprende alcohol alifático y agua en una relación de 1:1 a 9:1, preferiblemente 4:1; y el alcohol alifático se selecciona de un grupo que comprende alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol propílico y alcohol isopropílico o cualquier combinación de los mismos.
- 40 8. El método según la reivindicación 5, en el que la masa se disuelve en agua desionizada.
9. El método según la reivindicación 5, en el que la purificación se lleva a cabo para obtener el trigonósido Ib con una pureza que varía de 90 % a 95 % y la vicenina-1 con una pureza que varía de 90 % a 95 % y la purificación comprende las etapas de tratamiento con tampón seguido de tratamiento con alcohol o ácido y concentración para obtener polvo fluido purificado.
- 45 10. El método según la reivindicación 5, en el que la concentración se lleva a cabo a una temperatura que varía de 40 °C a 80 °C, preferiblemente a 50 °C.
- 50 11. El método según la reivindicación 5, en el que la composición tiene el trigonósido Ib cuya concentración varía del 40 % (p/p) al 90 % (p/p) y la vicenina-1 cuya concentración varía del 1 % (p/p) al 20 % (p/p).
- 55 12. El método según la reivindicación 5, en el que el excipiente se selecciona de un grupo que comprende agentes de granulación, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes disgregantes, agentes edulcorantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes de recubrimiento, plastificantes, conservantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, material celulósico y agentes de esferonización o cualquier combinación de los mismos.
- 60 13. Una composición que consiste en trigonósido Ib y vicenina-1, opcionalmente junto con al menos un excipiente, para su uso en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios.
14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el trastorno autoinmunitario se selecciona de un grupo que comprende enfermedad de Goodpasture, glomerulonefritis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y púrpura trombocitopénica idiopática.
- 65 15. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la composición se administra a un

sujeto que lo necesita; y el sujeto es un animal o un ser humano.

16. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en la que la composición se administra en una dosis diaria que varía de 1 mg/kg a 100 mg/kg en animales y de 1 mg/kg a 50 mg/kg en seres humanos.

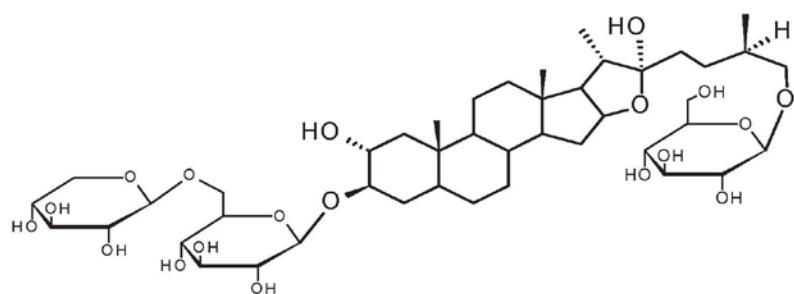


FIGURA 1

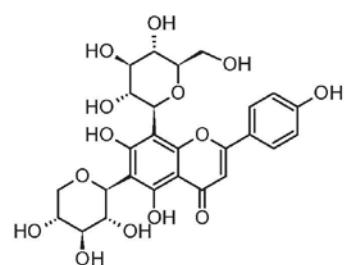


FIGURA 2

ES 2 664 187 T3

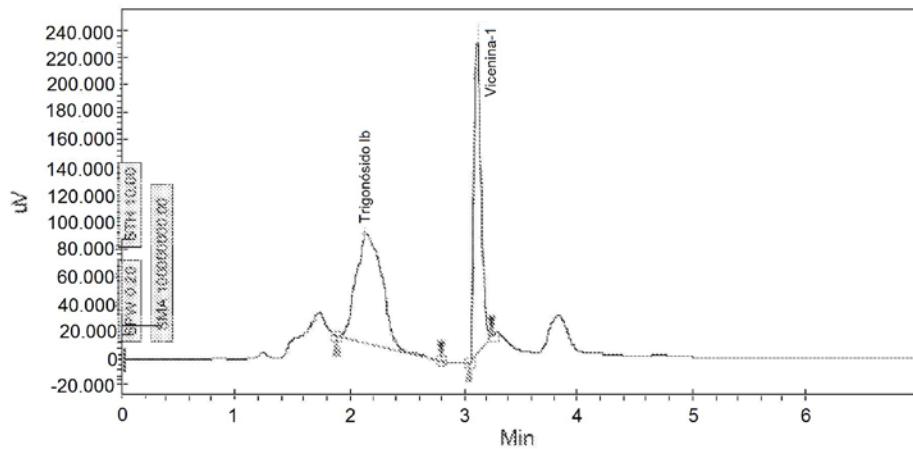


FIGURA 3

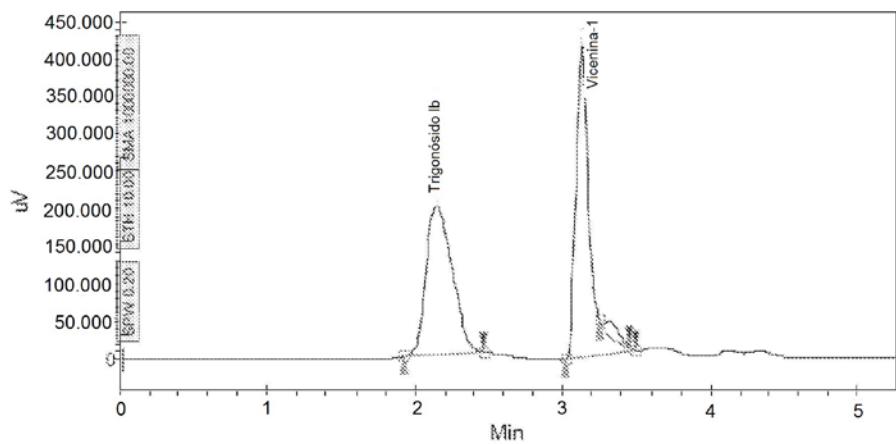


FIGURA 4

ES 2 664 187 T3

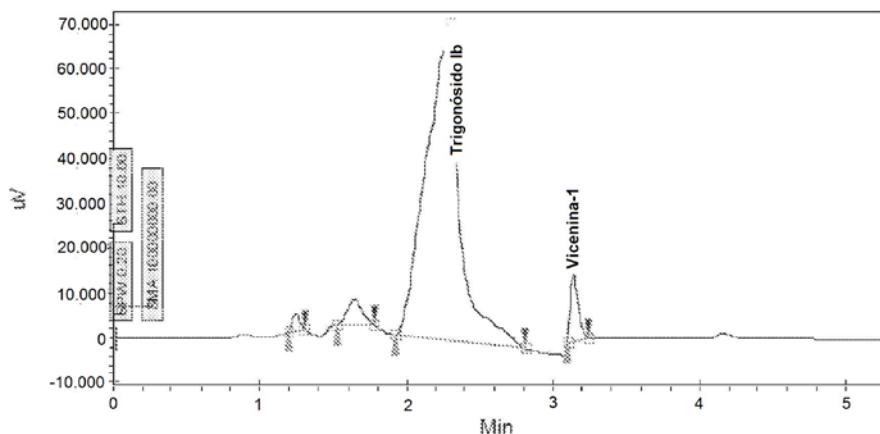


FIGURA 5

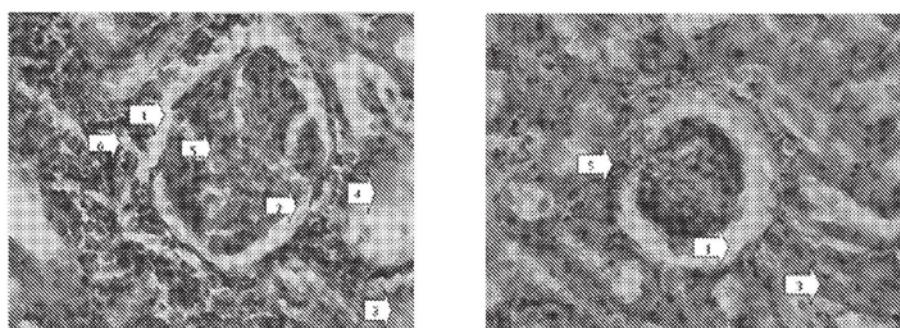


FIGURA 6