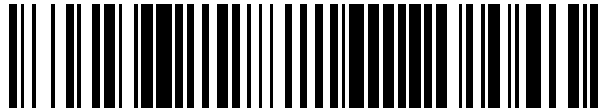


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 027**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7042 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2015 PCT/CN2015/078187**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015 WO15165422**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2015 E 15786043 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 3137089**

54 Título: **Uso de ginsenósido M1 para el tratamiento de nefritis lúpica**

30 Prioridad:

02.05.2014 US 201461987631 P

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

13.03.2019

73 Titular/es:

**LEE, SHEAU-LONG (100.0%)
12F., No.28 Bainian 3rd St., Longtan Dist.
Taoyuan City 32560, TW**

72 Inventor/es:

**LEE, YU-CHIEH;
CHEN, ANN;
HUA, KUO-FENG;
KA, SHUK-MAN;
LEE, SHEAU-LONG y
HSU, WAN-HAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 704 027 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

Uso de ginsenósido M1 para el tratamiento de nefritis lúpica

Campo de la invención

La presente invención se refiere a ginsenósido M1 para su uso en el tratamiento de nefritis lúpica.

5 **Antecedentes de la invención**

La nefritis lúpica tiene lugar en una subpoblación de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), y es una de las complicaciones más graves del LES, asociada a una morbilidad y mortalidad significativas. El lupus eritematoso sistémico (LES) es un trastorno autoinmune que implica lesión de múltiples órganos debido a la producción de anticuerpos y a una inmunidad celular anómala. Los riesgos acumulados de insuficiencia renal terminal fueron particularmente altos en pacientes con nefritis lúpica grave, cuya histopatología comprende distintos patrones de lesiones que se definieron inicialmente en la Clasificación de 1982 de la Organización Mundial de la Salud como categoría III, categoría IV y categorías Vc y Vd. Los mecanismos exactos para el desarrollo de la progresión de la nefritis lúpica aún no están claros. No hay un tratamiento definitivo para la nefritis lúpica. Las terapias actuales para la nefritis lúpica son diversas combinaciones de corticosteroides con otros agentes citotóxicos o inmunomoduladores, pero muchos de estos tienen diversos efectos secundarios.

Los ginsenósidos, los principales principios activos del *ginseng*, son conocidos por tener una variedad de funciones farmacológicas, por ejemplo, funciones antitumorales, antidiabéticas, antifatiga, antialérgica y antioxidante. Los ginsenósidos comparten una estructura básica, compuesta de un núcleo de esteroide de gonano que tiene 17 átomos de carbono dispuestos en cuatro anillos. Los ginsenósidos se metabolizan en el cuerpo, y una serie de estudios recientes sugieren que los metabolitos de ginsenósido, en lugar de los ginsenósidos de origen natural, se absorben fácilmente en el cuerpo y actúan como los componentes activos. Entre ellos, el ginsenósido M1 es conocido como un metabolito de los ginsenósidos de tipo protopanaxadiol a través de la ruta de gipenósido mediante bacterias intestinales humanas. Hasta ahora, ninguna de las referencias anteriores de la técnica documenta el efecto del ginsenósido M1 en el tratamiento de nefritis lúpica.

El documento US 2013/178436 A1 desvela una composición para la prevención, la mejora o el tratamiento de nefropatías, incluyendo la composición como principio activo un producto de reacción de pardeamiento de Maillard obtenido mediante la reacción de ginsenósido Re, un extracto de la planta de la especie *Panax* que incluye ginsenósido Re, o glucosa con aminoácido a una temperatura de 100 a 130° C, durante 0,5 a 12 horas.

El documento TW200930397 desvela una composición farmacéutica que comprende un extracto de *ginseng* que incluye ginsenósidos para el principio activo de nefropatía por ácido aristolóquico.

Breve resumen de la invención

En la presente invención, se ha descubierto de manera inesperada que el ginsenósido M1 es eficaz en la mejora de los síntomas de nefritis lúpica. Por lo tanto, la presente invención proporciona una nueva estrategia para el tratamiento de nefritis lúpica en un sujeto.

En particular, la presente invención desvela Ginsenósido M1 para su uso en el tratamiento de nefritis lúpica, en la que el ginsenósido M1 se usa en una cantidad eficaz para el sujeto que lo necesite.

De manera específica, el Ginsenósido M1 para su uso tal y como se desvela anteriormente, en el que el ginsenósido M1 es eficaz en la reducción de uno o más síntomas de nefritis lúpica en el sujeto, seleccionado entre el grupo que consiste en (1) en el glomérulo: proliferación celular intrínseca, depósitos semilunares, infiltración de neutrófilos y necrosis fibrinoide; y (2) en el compartimento tubulointersticial: inflamación intersticial (especialmente periglomerular) de leucocitos mononucleares y atrofia tubular con cilindros proteináceos. También, el ginsenósido M1 de la presente invención es eficaz en la reducción de la proteinuria o de la hematuria o en la reducción de los niveles de nitrógeno ureico en suero o el nivel de creatinina en suero en el sujeto.

En algunas realizaciones, el ginsenósido M1 se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos para su uso en el tratamiento de nefritis lúpica, que incluye pero no se limita a los corticosteroides (tales como prednisolona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos citotóxicos (tales como ciclofosfamida, clorambucil y azatioprina), inmunosupresores (tales como ciclosporina y micofenolato de mofetilo) y vasodilatadores (tales como inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (inhibidores ECA).

También se describe el uso de ginsenósido M1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la nefritis lúpica.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción que se presenta a continuación. Otras características o ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias realizaciones y también a partir de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

A efectos de ilustrar la invención, se muestran los dibujos de las realizaciones. Debería entenderse, sin embargo, que la invención no se limita a las realizaciones preferidas mostradas. En los dibujos:

5 La Fig. 1 muestra la evaluación de proteína de orina, de hematuria y de función renal en ratones. (A) proporción de albúmina/creatinina de la orina, (B) niveles de hematuria, (C) niveles de nitrógeno ureico en sangre (NUS), (D) creatinina sérica. Cada barra representa la media \pm EE. * p <0,05 y ** p <0,01, y *** p <0,005. El símbolo "#" significa "no detectable". El símbolo "ns" significa "no significativo".

10 La Fig. 2 muestra (A) la evaluación histopatológica renal mediante tinción con H&E (aumento original de x400 cada una) y (B) puntuación (análisis semicuantitativo). Cada barra representa la media \pm EE. *** p <0,005 representa la significación estadística. El símbolo "#" significa "no detectable". El símbolo "ns" significa "no significativo".

La Fig. 3 muestra los niveles séricos de anticuerpos anti-ADNdc en ratones. Cada barra representa la media \pm EE. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,005.

15 La Fig. 4 muestra (A) los niveles de anión superóxido en tejidos renales de ratones, (B) la producción renal de ROS *in situ* (el aumento original es de x400 cada uno) y (C) el análisis semicuantitativo del % de núcleos con tinción positiva. Cada barra representa la media \pm EE. ** p <0,01, *** p <0,005.

La Fig. 5 muestra los niveles séricos de citocinas inflamatorias. (A) IFN- γ , (B) MCP-1, (C) IL-12 p70, (D) IL-6, (E) TNF- α y (F) IL-10. Cada barra representa la media \pm EE. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,005. El símbolo "#" significa "no detectable". El símbolo "ns" significa "no significativo".

20 La Fig. 6 muestra la proliferación de linfocitos T en esplenocitos de ratones. Cada barra representa la media \pm EE. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,005. El símbolo "ns" significa "no significativo".

La Fig. 7 muestra los niveles de ARNm de TLR7. Cada barra representa la media \pm EE. * p <0,05, ** p <0,01.

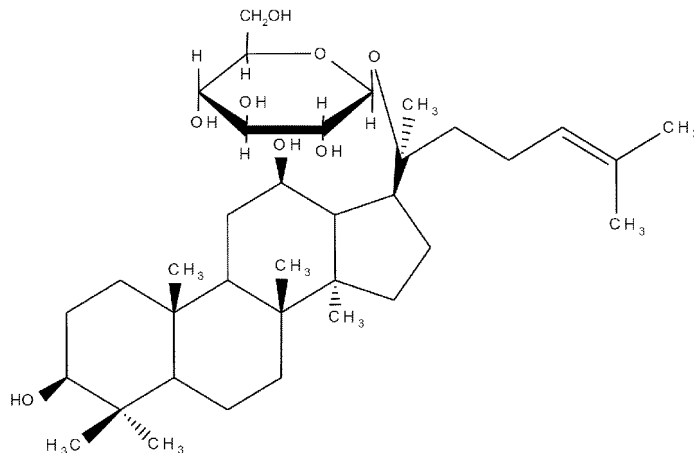
Descripción detallada de la invención

25 Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que la presente invención pertenece. Tal como se utiliza en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados que se les asigna a menos que se especifique otra cosa.

30 Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

35 En la presente invención, se descubrió de manera inesperada que el ginsenósido M1 puede evitar el desarrollo de nefritis lúpica administrándolo a ratones propensos al lupus NZB/W F1. En particular, se ha descubierto que los animales con nefritis lúpica presentan diversos síntomas que incluyen (1) en el glomérulo: proliferación celular intrínseca, depósitos semilunares, infiltración de neutrófilos y necrosis fibrinoide; o (2) en el compartimento tubulointerstitial: inflamación intersticial (especialmente periglomerular) de leucocitos mononucleares y atrofia tubular con cilindros proteináceos, o proteinuria o hematuria o niveles elevados de nitrógeno ureico de suero o niveles de creatinina en suero. El procedimiento de la invención es eficaz en la mejora de uno cualquiera de estos síntomas en pacientes con nefritis lúpica mediante la administración de ginsenósido M1.

40 El Ginsenósido M1, 20-O- β -D-glucopiranosil-20(S)-protopanaxadiol, es uno de los metabolitos de saponina conocidos en la materia. La estructura química del ginsenósido M1 es tal como sigue:



El ginsenósido M1 es conocido como un metabolito de los ginsenósidos de tipo protopanaxadiol a través de la ruta de gipenósido mediante bacterias intestinales humanas. El ginsenósido M1 se puede encontrar en la sangre o en la

orina tras la ingesta. El ginsenósido M1 se puede preparar a partir de plantas de *ginseng* a través de la fermentación de hongos mediante procedimientos conocidos en la materia, tales como la solicitud de patente de Taiwan N.º 094116005 (I280982) y la patente de Estados Unidos N.º 7.932.057. En determinadas realizaciones, las plantas de *ginseng* para la preparación del ginsenósido M1 incluyen la familia *Araliaceae*, el género *Panax*, por ejemplo *P. ginseng* y *P. pseudo-ginseng* (también llamada Sanqi). En general, el procedimiento de preparación de ginsenósido M1 incluye las etapas de (a) proporcionar polvo de materiales vegetales de *ginseng* (por ejemplo, hojas o tallos); (b) proporcionar un hongo para fermentar los materiales vegetales de *ginseng*, en los que la temperatura de fermentación oscila de 20-50° C, la humedad de la fermentación oscila del 70-100 %, el valor de pH oscila de 4,0-6,0 y el período de fermentación oscila de 5-15 días; (c) extraer y recolectar los productos de fermentación; y (d) aislar 20-O-β-D-glucopiranosil-20(S)-protopanaxadiol de los productos de fermentación.

Cuando el ginsenósido M1 se describe como "aislado" o "purificado" en la presente invención, se debería de entender como no absolutamente aislado o purificado, sino relativamente aislado o purificado. Por ejemplo, el ginsenósido M1 se refiere a uno que está más purificado en comparación con su forma existente natural. En una realización, una preparación que comprende ginsenósido M1 purificado puede comprender ginsenósido M1 en una cantidad de más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 % o el 100 % (p/p) de la preparación total. Debería de entenderse que cuando en el presente documento se usa un determinado número para mostrar una proporción o dosificación, dicho número generalmente lo incluye que dentro del intervalo del 10 % más y menos, o más específicamente, el alcance del 5 % más y menos que el número.

La presente invención proporciona ginsenósido M1 para su uso en el tratamiento de nefritis lúpica, en la que el ginsenósido M1 se usa en una cantidad eficaz para el sujeto que lo necesite. También se describe el uso de ginsenósido M1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la nefritis lúpica en un sujeto que necesite tal tratamiento. El medicamento de la invención es eficaz en la reducción de uno o más síntomas de nefritis lúpica en el sujeto, seleccionado entre el grupo que consiste en (1) en el glomérulo: proliferación celular intrínseca, depósitos semilunares, infiltración de neutrófilos y necrosis fibrinoide; y (2) en el compartimento tubulointersticial: inflamación intersticial (especialmente periglomerular) de leucocitos mononucleares y atrofia tubular con cilindros proteináceos. También, el medicamento de la invención es eficaz en la reducción de la proteinuria o de la hematuria o en la reducción de los niveles de nitrógeno ureico en suero o el nivel de creatinina en suero en el sujeto.

El término "individuo" o "sujeto" usado en el presente documento incluye al ser humano y animales no humanos tales como animales de compañía (tales como perros, gatos y similares), animales de granja (tales como vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares), o animales de laboratorio (tales como ratas, ratones, cobayas y similares).

El término "tratamiento" tal como se usa en el presente documento se refiere a la aplicación o administración de una composición que incluye uno o más agentes activos a un sujeto afligido por un trastorno, un síntoma o afecciones del trastorno, o una progresión del trastorno, con el fin de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, subsanar, mejorar o afectar al trastorno, a los síntomas o afecciones del trastorno, a las discapacidades inducidas por el trastorno o a la progresión del trastorno.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" usada en el presente documento se refiere a la cantidad de un principio activo para conferir un efecto terapéutico en un sujeto tratado. Por ejemplo, una cantidad eficaz para el tratamiento de nefritis lúpica es una cantidad que puede impedir, mejorar, aliviar o reducir uno o más síntomas o afecciones tales como (1) en el glomérulo: proliferación celular intrínseca, depósitos semilunares, infiltración de neutrófilos y necrosis fibrinoide; o (2) en el compartimento tubulointersticial: inflamación intersticial (especialmente periglomerular) de leucocitos mononucleares y atrofia tubular con cilindros proteináceos, o proteinuria o hematuria o niveles anómalamente elevados de nitrógeno ureico de suero o niveles de creatinina en suero, en un sujeto que tiene nefritis lúpica. Los síntomas se pueden determinar y evaluar usando los procedimientos conocidos en la materia basados en diversos índices relacionados con el progreso de la enfermedad, por ejemplo, analizando la cantidad de proteína en la orina, de nitrógeno ureico en sangre o de creatinina sérica, o analizando secciones renales. La cantidad terapéuticamente eficaz puede cambiar en función de diversos motivos, tal como la vía de administración y la frecuencia, el peso corporal y la especie de los individuos que reciben dicho producto farmacéutico, y el fin de la administración. Los expertos en la materia pueden determinar la dosificación en cada caso basándose en la divulgación en el presente documento, en los procedimientos establecidos y en su propia experiencia. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la dosificación oral de ginsenósido M1 usada en la presente invención es de 10 a 1.000 mg/kg al día. En algunos ejemplos, la dosificación oral de ginsenósido M1 usada en la presente invención es de 100 a 300 mg/kg al día, de 50 a 150 mg/kg al día, de 25 a 100 mg/kg al día, de 10 a 50 mg/kg al día, o de 5 a 30 mg/kg al día. Además, en algunas realizaciones de la invención, el ginsenósido M1 se administra periódicamente durante un determinado período de tiempo, por ejemplo, la administración diaria durante al menos 15 días, un mes o dos meses o más.

De acuerdo con la presente invención, se puede usar ginsenósido M1 como un principio activo para el tratamiento de la nefritis lúpica. En una realización, se puede formular una cantidad terapéuticamente eficaz del principio activo con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una composición farmacéutica de una forma apropiada para el fin de administración y absorción. En función del modo de administración, la composición farmacéutica de la presente invención preferentemente comprende aproximadamente el 0,1 % en peso a aproximadamente el 100 % en peso del principio activo, en el que el porcentaje en peso se calcula basándose en el peso de la composición completa.

Tal como se utiliza en el presente documento, "farmacéuticamente aceptable" significa que el vehículo es compatible con el principio activo en la composición, y preferentemente puede estabilizar dicho principio activo y es seguro para el individuo que recibe el tratamiento. Dicho vehículo puede ser un diluyente, transportador, excipiente o matriz para el principio activo. Algunos ejemplos de excipientes apropiados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbosa, manosa, almidón, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, goma de tragacanto, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua esterilizada, jarabe y metilcelulosa. La composición puede comprender adicionalmente lubricantes, tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; emulsionantes y agentes de suspensión; conservantes, tales como metil y propil hidroxibenzoatos; edulcorantes; y agentes aromatizantes. La composición de la presente invención puede proporcionar el efecto de una liberación rápida, continua o retardada del principio activo tras la administración al paciente.

De acuerdo con la presente invención, la forma de dicha composición puede ser comprimidos, píldoras, polvo, pastillas para chupar, envases, trociscos, elixires, suspensiones, lociones, soluciones, jarabes, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, inyección estéril de líquido, y polvo envasado.

La composición de la presente invención se puede administrar a través de cualquier ruta fisiológicamente aceptable, tal como oral, parenteral (tal como intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal), transdérmica, con supositorios y por procedimientos intranasales. En relación con la administración parenteral, preferentemente se usa en la forma de una solución de agua estéril, que puede comprender otras sustancias, tal como suficientes sales o glucosa para hacer la solución isotónica a la sangre. La solución de agua se puede tamponar de manera apropiada (preferentemente a un valor de pH de 3 a 9), según se necesite. La preparación de una composición parenteral apropiada en condiciones estériles se puede lograr con técnicas farmacológicas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia, sin que se requieran trabajos creativos adicionales.

De acuerdo con la presente invención, el ginsenósido M1 o las composiciones que comprenden ginsenósido M1 como el principio activo se pueden usar en el tratamiento de individuos con nefritis lúpica. De manera específica, el ginsenósido M1 o las composiciones que comprenden ginsenósido M1 como el principio activo se pueden administrar a individuos con nefritis lúpica o a individuos en riesgo de adquirir nefritis lúpica para prevenir la aparición de la enfermedad o mejorar los síntomas o retrasar el deterioro de los síntomas.

Además, de acuerdo con la presente invención, el ginsenósido M1 o las composiciones que comprenden ginsenósido M1 como el principio activo se pueden usar en combinación con los procedimientos terapéuticos o medicamentos existentes, tales como el tratamiento farmacéutico, que incluye pero no se limita a los corticosteroides (tales como prednisolona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos citotóxicos (tales como ciclofosfamida, clorambucil y azatioprina), inmunosupresores (tales como ciclosporina y micofenolato de mofetilo) y vasodilatadores (tales como inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (inhibidores ECA)). En una realización, el medicamento o el procedimiento terapéutico usado en combinación se puede usar de manera simultánea (paralelo) o de manera secuencial. Cuando se usan los medicamentos en combinación, los medicamentos se pueden mezclar en la misma fórmula o se pueden poner en diferentes fórmulas de forma separada, tal como cápsulas separadas, píldoras, comprimidos e inyecciones.

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, que se proporcionan con el fin de demostración en lugar de limitación.

Ejemplo

1. Materiales y procedimientos

1.1 Modelo animal y protocolo experimental

Se encargaron ratones hembra NZB/W F1 de Jackson Lab. Todos los experimentos con animales se realizaron con la aprobación ética del Institutional Animal Care and Use Committee of The National Defense Medical Center, Taiwan y se realizaron de acuerdo con los principios éticos en la guía NIG para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio.

Se estableció un modelo de ratón de nefritis lúpica grave acelerada (ASLN, del inglés *accelerated severe lupus nephritis*) en ratones hembra NZB/W F1 de 8 semanas de vida mediante inyección intraperitoneal de dos veces a la semana de lipopolisacárido (LPS, 20 mg/kg de peso corporal) (Sigma, NO, EE.UU) tal como se describe en Shui y col., 2007 [51]. Dos días después de la primera dosis de LPS para la inducción de ASLN, se dividieron los ratones en dos grupos de más de 6 ratones cada uno y se les administró diariamente con ginsenósido M1 o vehículo (solución salina normal) a través de sonda oral hasta que se sacrificó a los ratones. Los ratones hembra NZB/W F1 de 8 semanas de vida (antes del inicio de la producción de autoanticuerpos), inyectados con solución salina normal, se usaron como controles normales. Se sacrificó a todos los ratones en la semana 5 después de la inducción de la enfermedad. Se tomaron muestras de tejido de bazo, de tejido cortical renal, de sangre y de orina en los momentos indicados y se almacenaron de forma apropiada antes del análisis.

1.2 Ginsenosido M1

El Ginsenosido M1, 20-O-β-D-glucopiranosil-20(S)-protopanaxadiol, se preparó mediante procedimientos conocidos en la materia, tal como los descritos en la Solicitud de Patente de Taiwan N.º 094116005 (I280982) y la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 7.932.057.

5 1.3 Análisis de proteína de orina y de función renal

Las muestras de orina se recolectaron en jaulas metabólicas cada semana y se midieron los niveles de proteína de orina, y se recolectaron muestras de suero para medir los niveles séricos de nitrógeno ureico en sangre (NUS) y de creatinina (Cr) tal como se describe previamente (Ka, S. M. y col. Decoy receptor 3 ameliorates an autoimmune crescentic glomerulonephritis model in mice. J Am Soc Nephrol 18:2473-2485; 2007).

10 1.4 Evaluación patológica

Los tejidos renales se fijaron con formalina, se embebieron en parafina y se prepararon secciones (3 μm) y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para la histopatología renal tal como se describe previamente. Se realizó el análisis cuantitativo mediante microscopía óptica (Olympus BX51, Sistema de fluorescencia reflejada, Japón). El examen de la patología renal y la puntuación se realizó a ciegas por un patólogo, y se puntuó la gravedad de las lesiones renales. Se calculó el porcentaje de los glomérulos que muestran proliferación, infiltración de neutrófilos, formación de depósitos semilunares, necrosis fibrinoide e inflamación periglomerular de al menos 100 glomérulos muestreados de manera aleatoria.

15 1.5 Medición de anticuerpos séricos anti-ADNdc

Los niveles séricos de anticuerpos anti-ADNdc se midieron usando un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Alpha Diagnostic, TX, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se midió la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas de ELISA (Bio-Tek, VT, EE.UU.).

20 1.6 Análisis de activación de linfocitos T

Se prepararon esplenocitos de los ratones tal como se describió anteriormente, después, se cultivaron por triplicado en pocillos (2,5 x 10⁵ células/pocillo) en placas de microtítulo de 96 pocillos de fondo plano previamente recubiertas toda la noche a 4 °C con 0,25 μg/ml de anticuerpos anti-CD3 de ratón (145-2C11) (BD Biosciences). Después de 48 h, a los cultivos se les administró 1 μl de ³H-metil timidina (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) y se recolectaron 16-18 h más tarde, y la ³H-metil timidina se midió usando un Top Count (Packard, PerkinElmer, Boston, MA) tal como se describe anteriormente.

25 1.7 Medición de especies reactivas del oxígeno (ROS)

La producción *in situ* en riñón de anión superóxido se determinó mediante marcaje de dihidroetidio (DHE). Las imágenes fluorescentes se cuantificaron mediante el recuento del porcentaje de núcleos positivos en el total de núcleos por sección transversal de riñón. Los niveles de anión superóxido en suero y en tejidos de riñón se midieron tal como se describe anteriormente y los resultados se expresaron como unidades relativas de luminiscencia (URL) por 15 minutos por miligramo de peso seco (es decir, URL/15 min/mg de peso seco).

30 1.8 Detección de citocina sérica

Para detectar el nivel de IFN-γ, MCP-1, IL-12 p70, IL-6, TNF-α e IL-10 en el suero se usó el kit BD Cytometric Bead Array Mouse Inflammation (BD Biosciences), de acuerdo con el protocolo estándar, seguido por la citometría de flujo (BD Biosciences).

35 1.9 PCR en tiempo real

El ARN de la corteza renal se extrajo usando el reactivo TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) se usó para medir la expresión génica del receptor de tipo Toll (TLR)7. La cuantificación en tiempo real se realizó usando un sistema Bio-Rad iCycler iQ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las amplificaciones se normalizaron a los valores para GARDH usando el procedimiento 2^{-ΔCt}.

40 1.10 Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como la media ± EEM. Las comparaciones entre dos grupos se realizaron usando el test de la t de Student. Se consideró un p-valor de <0,05 como estadísticamente significativo.

2. Resultados

2.1 El ginsenosido M1 mejoró la nefritis lúpica

50 Al detectar la proteinuria, en comparación con el grupo de control normal de ratones, el grupo de ASLN de ratones

mostró un aumento significativo de proteinuria (Fig. 1A) y hematuria (Fig. 1B) ($p < 0,005$). En comparación con el grupo de ASLN de ratones, las magnitudes de proteinuria y hematuria se redujeron significativamente en el grupo de ratones de ASLN + LCHK168 al detectar la protección de la función renal en ratones tratados con LCHK168, en comparación con el grupo de control normal de ratones, el grupo de ASLN de ratones mostró un aumento significativo de NUS (Fig. 1C) y de creatinina sérica (Fig. 1D) ($p < 0,05$). En comparación con el grupo de ASLN de ratones, los niveles séricos de NUS y de creatinina se redujeron de manera significativa en el grupo de ratones ASLN + LCHK168 ($p < 0,05$).

Además, la microscopía de luz mostró lesiones renales graves, que incluyen la infiltración de neutrocitos, la formación de depósitos de tipo semilunar en glomérulos, y la inflamación tubulointersticial (especialmente periglomerular), atrofia tubular y cilindros proteináceos y necrosis fibrinoide, en los ratones de ASLN de control de la enfermedad tratados con vehículo (ratones de ASLN + vehículo) (Fig. 2). En cambio, tales lesiones renales se redujeron considerablemente en ratones ASLN+M1 (en todos, $p < 0,005$) (Fig. 2), aunque estuvo presente la proliferación glomerular leve.

2.2 Medición del nivel de autoanticuerpos séricos

Dado que la deposición de complejos inmunitarios inducida por anticuerpos en los riñones se considera que es la causa principal de la nefritis lúpica, los presentes inventores midieron los niveles de autoanticuerpos anti-ADNdc en el suero. Tal como se muestra en la Figura 3, los niveles séricos de anticuerpo anti-ADNdc fueron significativamente mayores en el grupo ASLN de ratones que en los ratones de control normales. Después, en comparación con el grupo de ASLN de ratones, los niveles séricos de ADNdc se redujeron de manera significativa en el grupo de ratones ASLN + LCHK168 ($p < 0,01$).

2.3 El ginsenosido M1 redujo la producción renal de ROS

En comparación con los ratones de control normales, el grupo de ASLN de ratones mostró un aumento significativo en la expresión y producción renal de ROS tan pronto como en la semana 3 y aumentó drásticamente en la semana 5 en el grupo de ASLN de ratones. En comparación con el grupo de ASLN de ratones, la expresión de la producción renal de ROS se redujo de manera significativa en el grupo de ratones ASLN + LCHK168 ($p < 0,01$) (Fig. 4A).

Para detectar de manera más específica la producción local de ROS en el riñón, se realizó una detección *in situ* de la producción de ROS en tejido renal, usando el ensayo de DHE. Tal como se muestra en la Fig. 4B y 4C, aunque la fluorescencia de DHE fue baja en los riñones de ratón normal, aumentó significativamente en los riñones de ratones de control de ASLN en la semana 3, e incluso se potenció adicionalmente en la semana 5, indicando, por lo tanto, que la producción *in situ* de ROS había aumentado en el grupo de ASLN de ratones en comparación con los ratones de control normal. En cambio, se vio una intensidad de fluorescencia de DHE muy baja en el grupo de tratamiento ASLN + LCHK168, tanto en la semana 3 como en la semana 5.

2.4 Supresión de la expresión de citocina inflamatoria sérica con LCHK168.

Para medir los niveles séricos de interferón- γ (IFN- γ), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), IL-12 p70, IL-6, TNF α e IL-10 en los ratones. Tal como se muestra en la Figura 5A, los niveles séricos de IFN- γ aumentaron significativamente tan pronto como en la semana 3 y aumentaron de manera drástica en la semana 5 en el grupo ASLN de ratones. En comparación con el grupo de ASLN de ratones, la expresión de IFN- γ se redujo significativamente en el grupo de ratones ASLN + LCHK168 ($p < 0,01$). Después, tal como se muestra en la Fig. 5B-F, los niveles séricos de MCP-1, IL-12 p70, IL-6, TNF α e IL-10 aumentaron significativamente tan pronto como en la semana 3 y aumentaron de manera drástica en la semana 5 en el grupo ASLN de ratones. En comparación con el grupo de ASLN de ratones, la expresión de MCP-1, IL-12 p70, IL-6, TNF α e IL-10 se redujo de manera significativa en el grupo de ratones ASLN + LCHK168 ($p < 0,005$).

2.5 El ginsenosido M1 inhibió la proliferación de linfocitos T

En comparación con los ratones de control normales, el grupo de ASLN de ratones mostró un aumento significativo en la proliferación de linfocitos T en esplenocitos tan pronto como en la semana 3 y aumentó drásticamente en la semana 5 en el grupo de ASLN de ratones. En comparación con el grupo de ASLN de ratones, la proliferación de linfocitos T en esplenocitos se redujo significativamente en el grupo de ratones ASLN + LCHK168 ($p < 0,01$) (Fig 6)

2.6 Inhibición de la producción de ARNm del receptor 7 de tipo Toll.

Los resultados de la RT-PCR en tiempo real demostraron un aumento en los niveles renales de ARNm de TLR7, tal como se muestra en la Fig. 7, los niveles de ARNm de TLR7 aumentaron de manera significativa en el grupo de ratones ASLN ($p < 0,005$). En comparación con el grupo de ASLN de ratones, los niveles de ARNm de TLR7 se redujeron de manera significativa en el grupo de ratones ASLN + LCHK168 ($p < 0,01$).

En resumen, el estudio de los presentes inventores muestra que el ginsenosido M1 es eficaz en la prevención del desarrollo de nefritis lúpica. Todos estos hallazgos sugieren que el ginsenosido M se puede desarrollar más como un nuevo fármaco candidato para el tratamiento de la nefritis lúpica.

REIVINDICACIONES

1. Ginsenosido M1 para su uso en el tratamiento de nefritis lúpica, en el que el ginsenosido M1 se usa en una cantidad eficaz para un sujeto que lo necesite.
- 5 2. Ginsenosido M1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ginsenosido M1 es eficaz en la reducción o en la mejora de uno o más síntomas de nefritis lúpica seleccionados del grupo que consiste en (1) en el glomérulo: proliferación celular intrínseca, depósitos semilunares, infiltración de neutrófilos y necrosis fibrinoide; y (2) en el compartimento tubulointerstial: inflamación intersticial de leucocitos mononucleares y atrofia tubular con cilindros proteináceos, en el sujeto.
- 10 3. Ginsenosido M1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ginsenosido M1 es eficaz en la reducción de la inflamación periglomerular de leucocitos mononucleares en el sujeto.
4. Ginsenosido M1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ginsenosido M1 es eficaz en la reducción de la proteinuria o de la hematuria o en la disminución de los niveles de nitrógeno ureico en suero o el nivel de creatinina en suero en el sujeto.
- 15 5. Ginsenosido M1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ginsenosido M1 se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de nefritis lúpica, seleccionados del grupo que consiste en corticosteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos citotóxicos, inmunosupresores y vasodilatadores.
- 20 6. Ginsenosido M1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 en el que el ginsenosido M1 se administra por vía oral en una dosificación de 10 a 1.000 mg/kg diariamente, preferentemente en una dosificación de 100 a 300 mg/kg diariamente.
7. Ginsenosido M1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en el que el ginsenosido M1 se usa en combinación con los procedimientos terapéuticos o medicamentos existentes.
- 25 8. Ginsenosido M1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que los medicamentos existentes son corticosteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos citotóxicos, inmunosupresores o vasodilatadores.

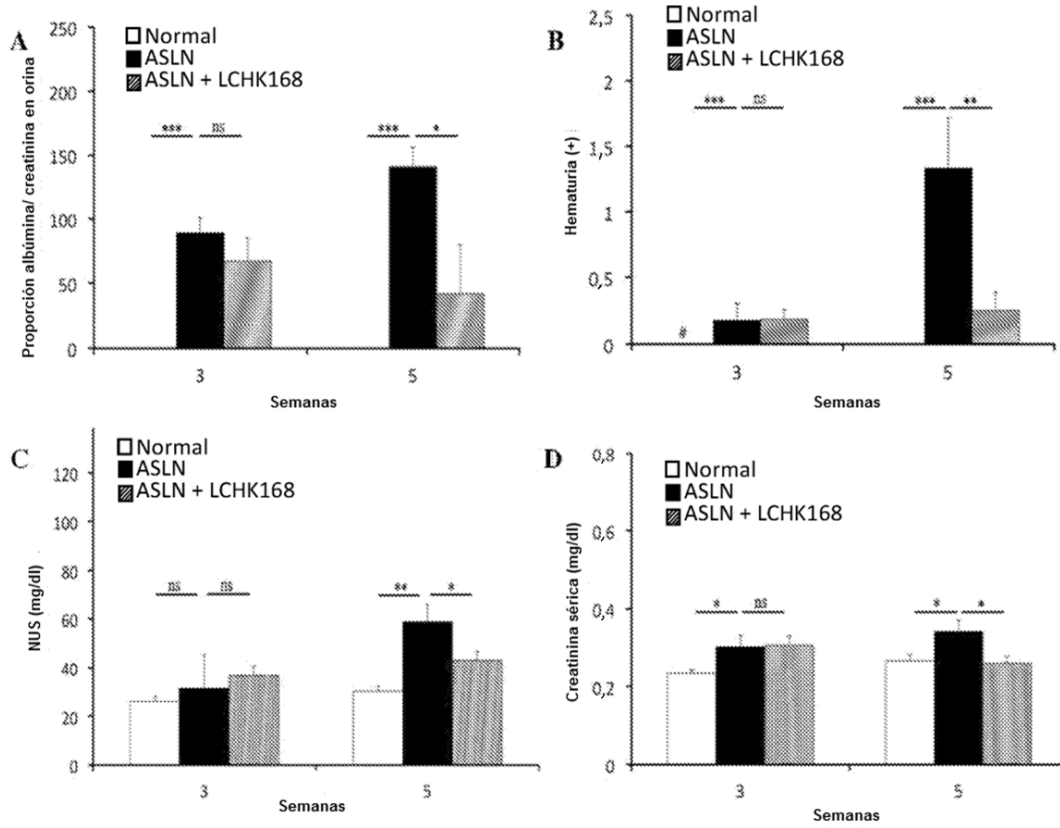


Fig. 1

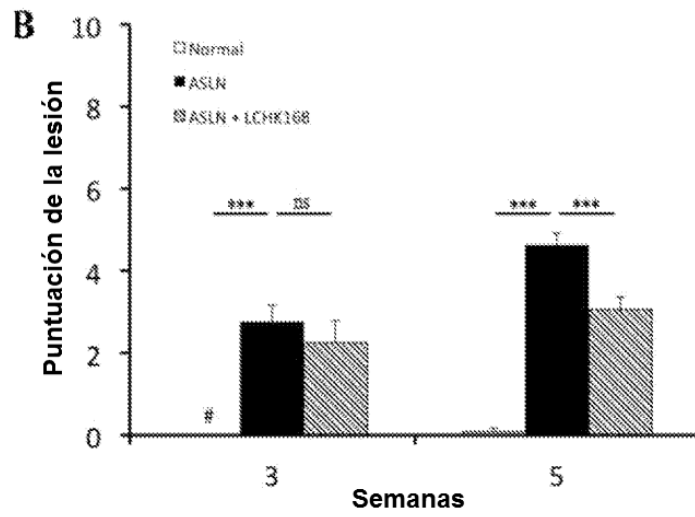
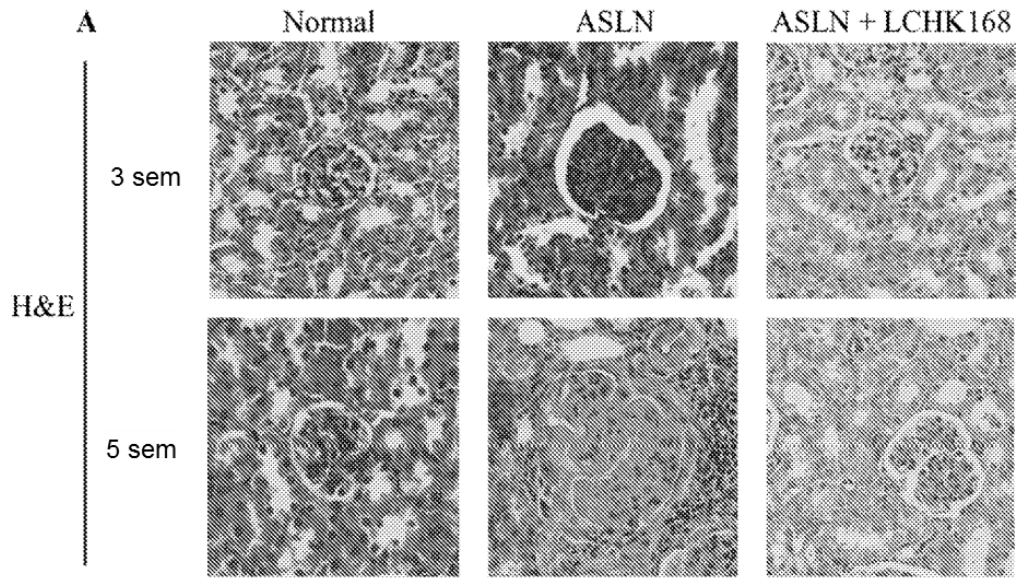


Fig. 2

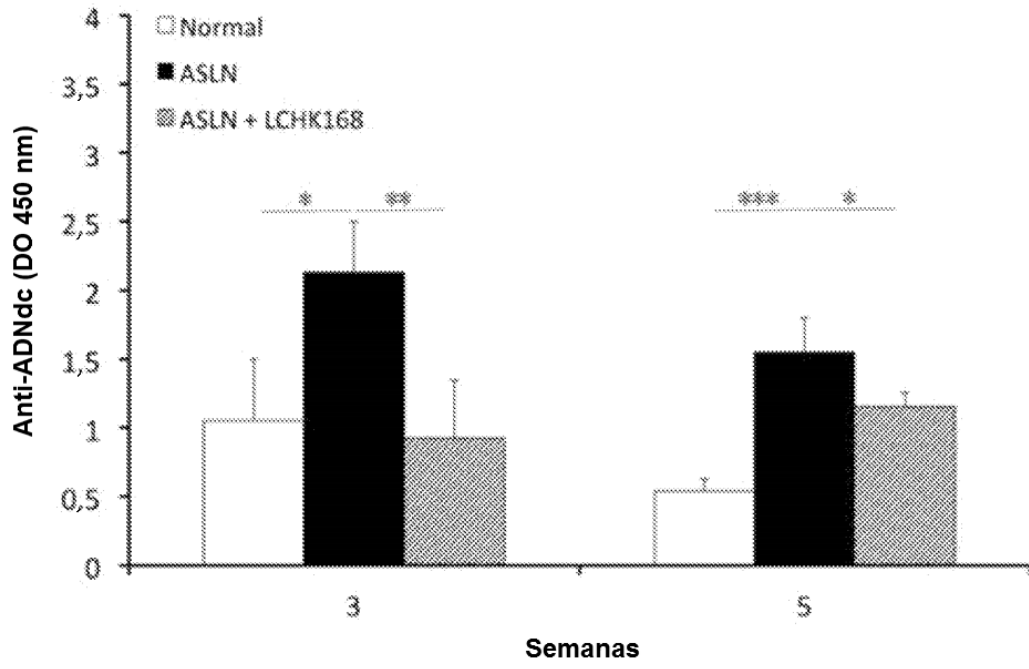


Fig. 3

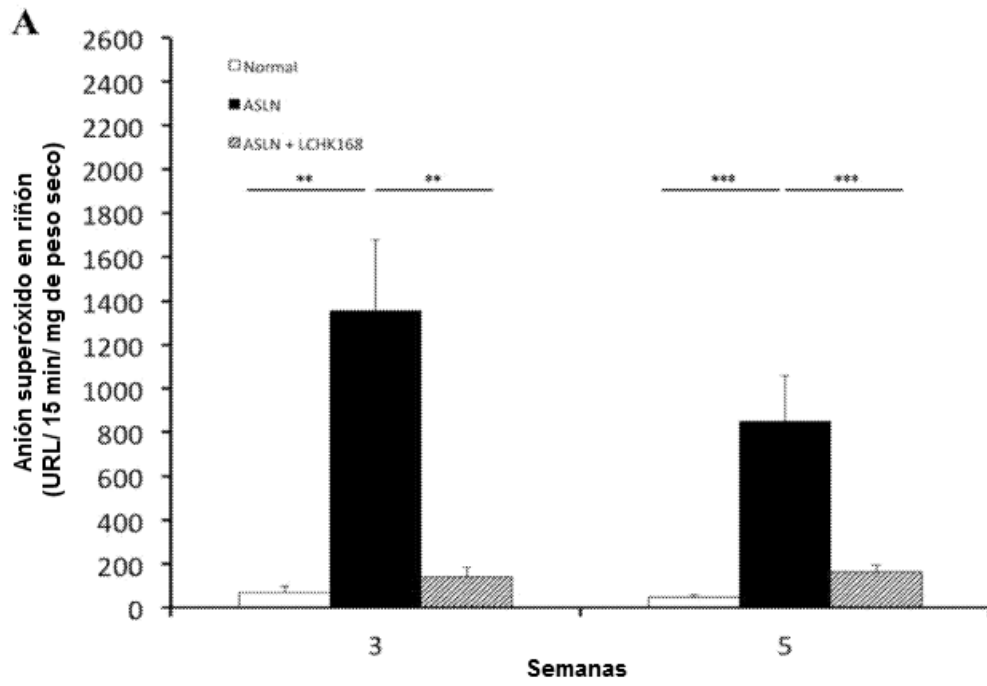
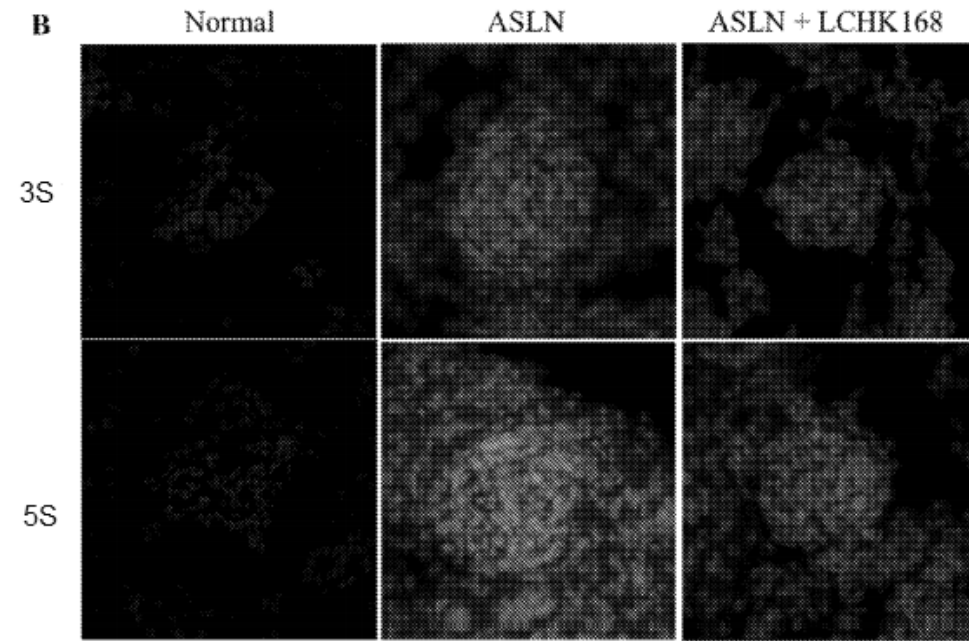


Fig. 4



C

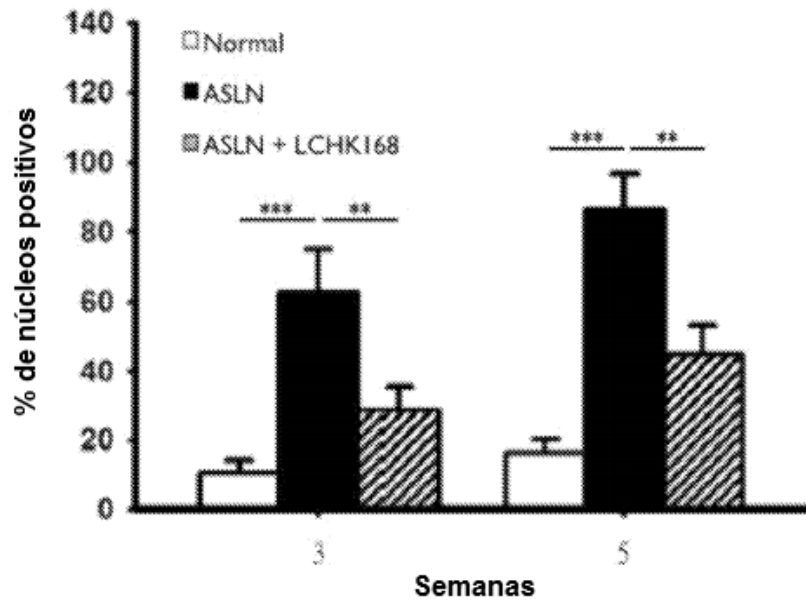


Fig. 4 (Cont')

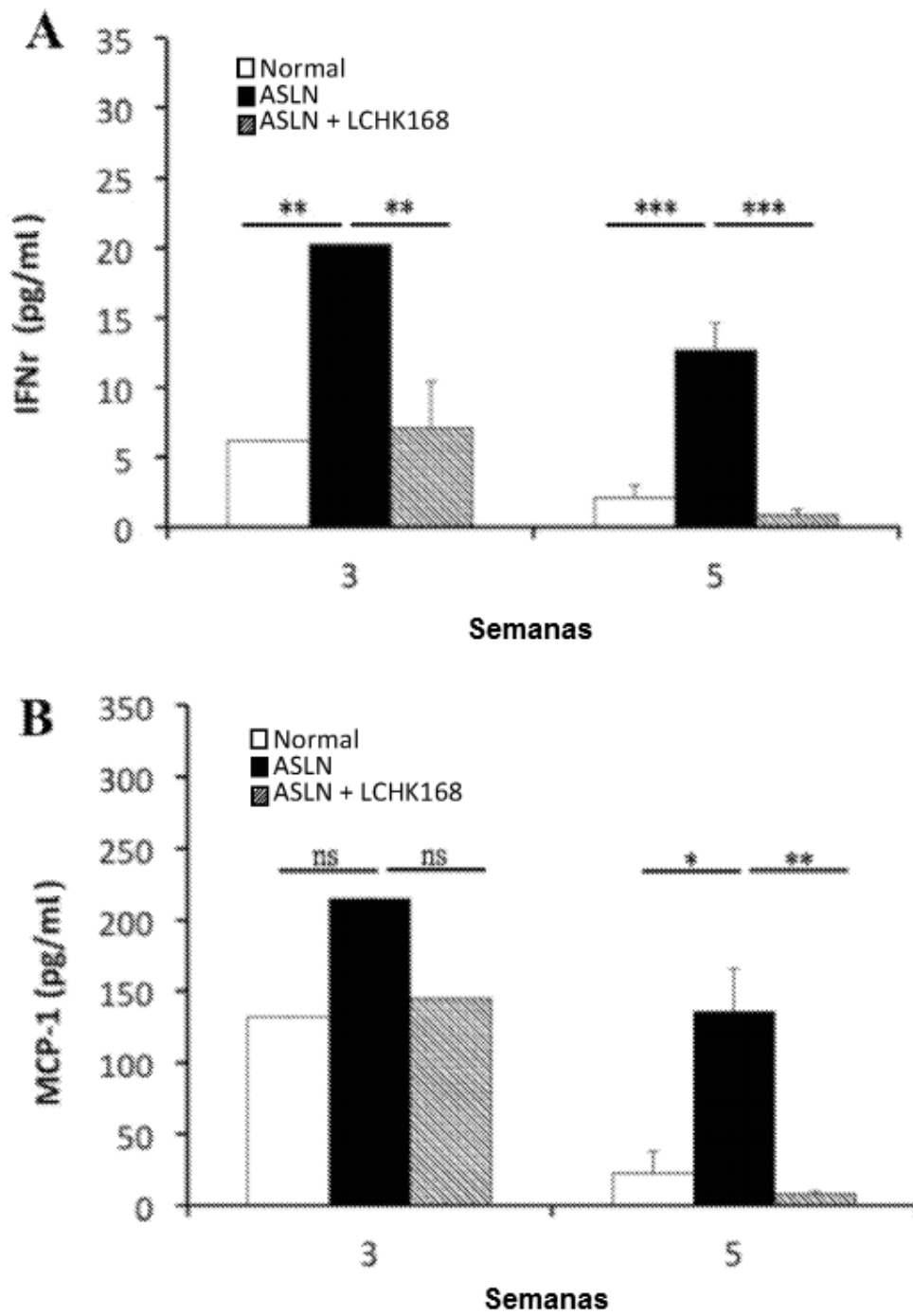


Fig. 5

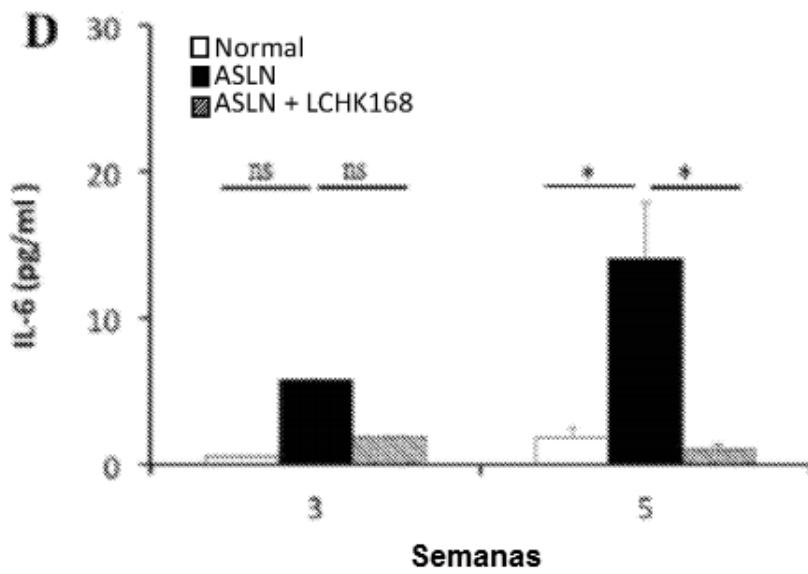
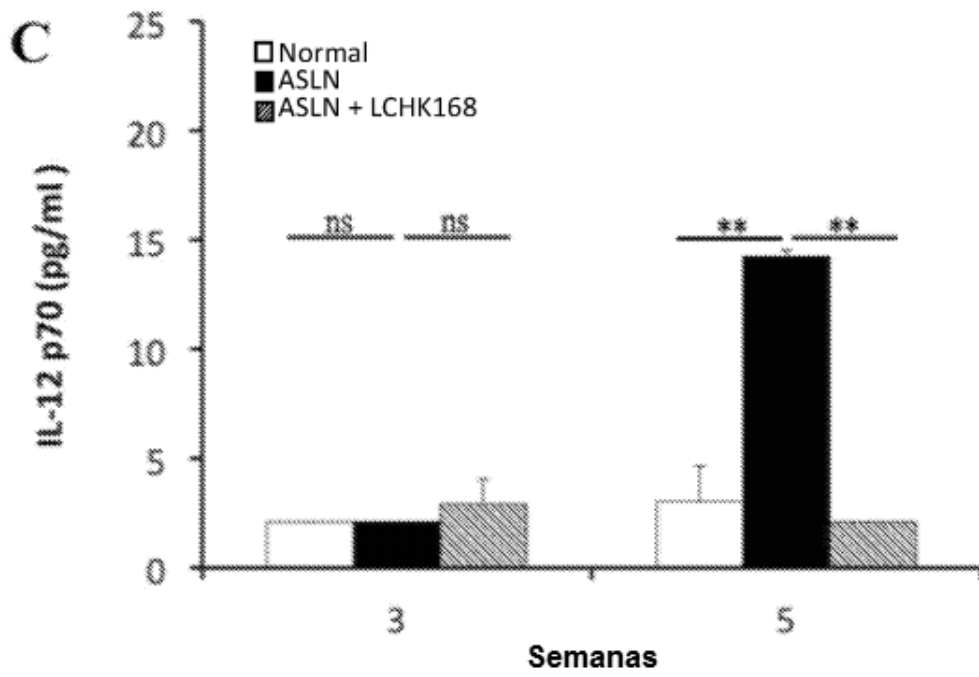


Fig. 5 (Cont')

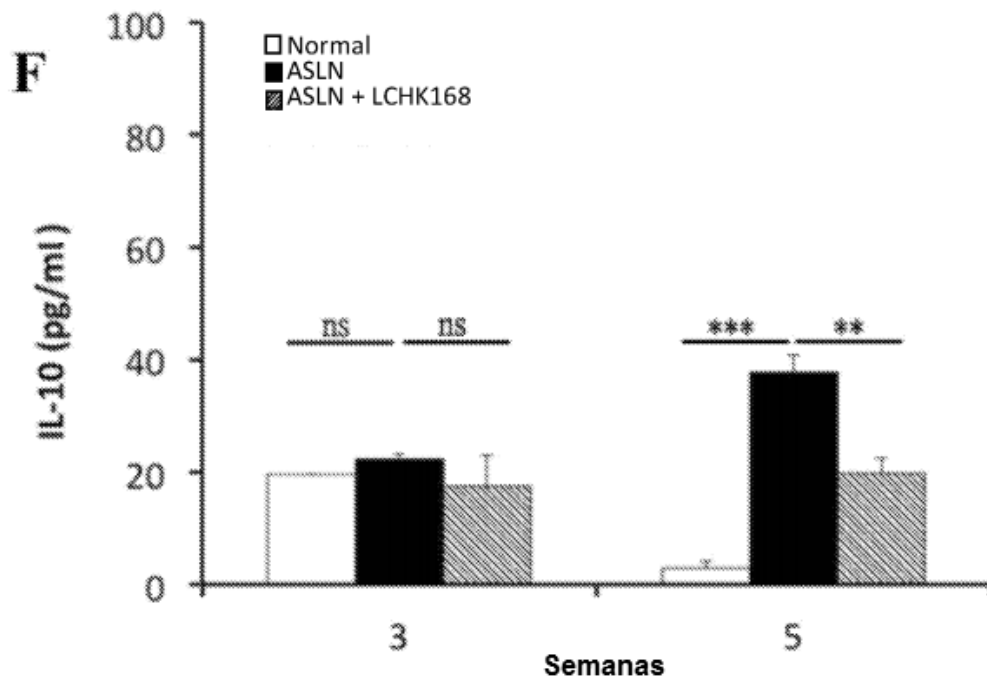
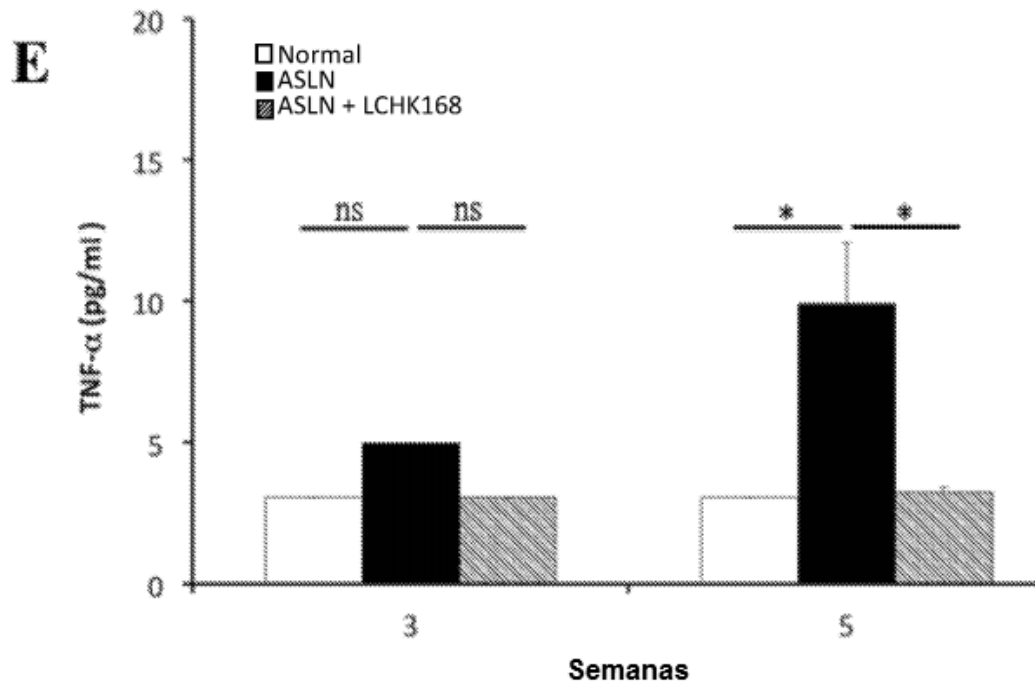


Fig. 5 (Cont')

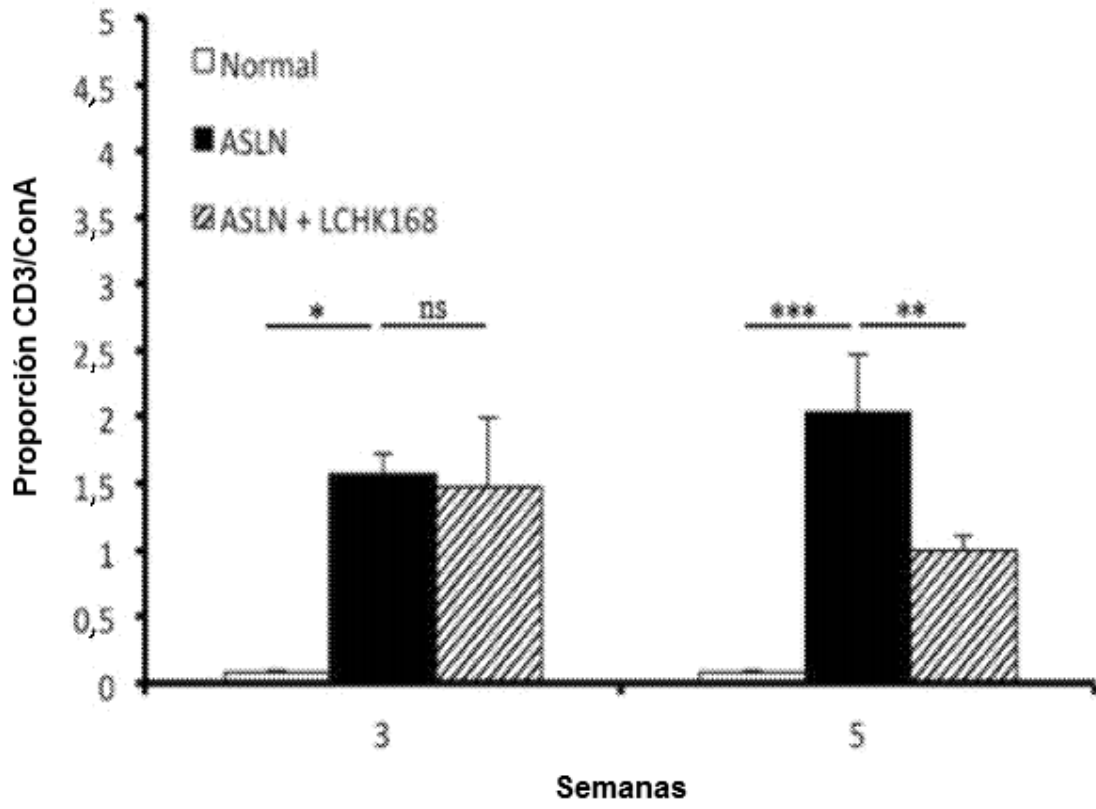


Fig. 6

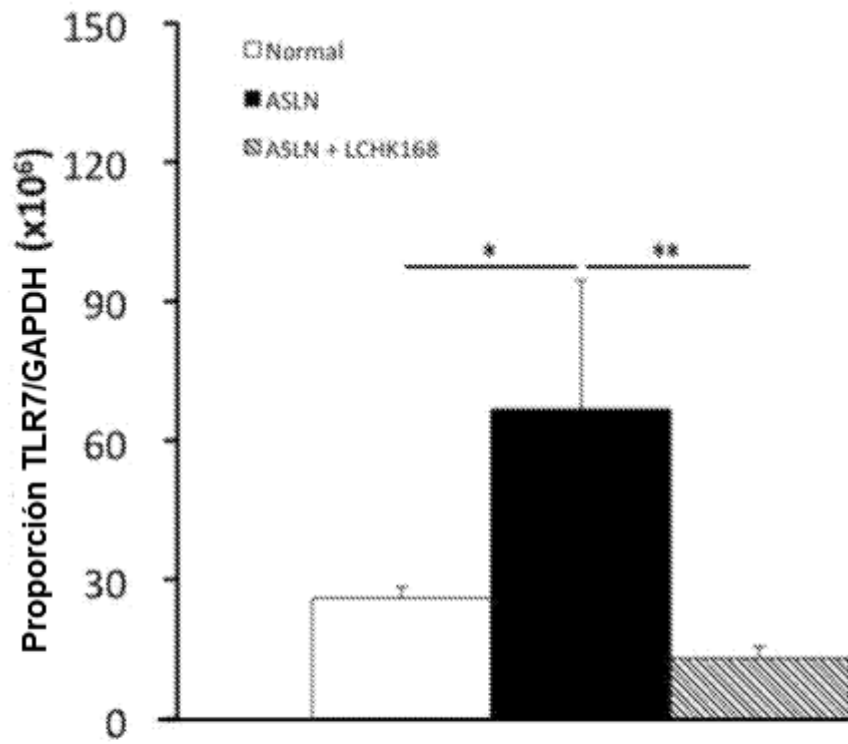


Fig. 7