

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 059**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7042 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2015 PCT/CN2015/093708**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16070795**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2015 E 15856570 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 3137090**

54 Título: **Uso de ginsenósido M1 para el tratamiento de nefropatía por IgA**

30 Prioridad:

03.11.2014 US 201462074247 P

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

14.03.2019

73 Titular/es:

**LEE, SHEAU-LONG (100.0%)
12F.-1, No.28, Bainian 3rd St., Longtan Dist.
Taoyuan 32560, TW**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 704 059 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 nefropatía por IgA

Solicitud relacionada

5 La presente solicitud reivindica prioridad para la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 62/074.247, presentada el 3 de noviembre de 2014.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a ginsenósido M1 para su uso en el tratamiento de nefropatía por IgA (NIgA).

Antecedentes de la invención

10 La nefropatía por IgA (NIgA) es la forma más común de glomerulonefritis (GN) en todo el mundo. La aparición de NIgA se puede asociar con una infección en las vías aéreas superiores [1,2]. Con frecuencia, los depósitos de C3 y de otras clases de inmunoglobulinas se detectan en un patrón similar al de la IgA. Las alteraciones histopatológicas más comunes incluyen la expansión focal o difusa de las regiones mesangiales con células proliferativas y matriz extracelular [3]. Adicionalmente, se pueden ver una amplia variedad de lesiones en pacientes con lesiones más graves, que incluyen la proliferación endocapilar difusa, la esclerosis segmentaria, la necrosis segmentaria y la formación de depósitos celulares en forma de medialuna [4,5]. Y se ha documentado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) desempeñan un papel patógeno principal en el desarrollo de una amplia variedad de trastornos glomerulares humanos y experimentales, incluyendo NIgA [6-8]. Aunque NIgA se considera una enfermedad del complejo inmunitario que es resultado de un daño glomerular de IgA-complejo inmunitario (IgA-CI), la causa de la enfermedad y los mecanismos patógenos que propagan esta enfermedad se desconocen.

20 Aunque se han usado esteroides glucocorticoides para tratar a algunos pacientes de NIgA, su eficacia en la preservación del deterioro de la función renal en NIgA permanece sin aclarar, y el uso a largo plazo de estos fármacos puede provocar efectos secundarios graves debido a los posibles efectos inmunosupresores [9-11].

25 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 metalizan 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 NIgA.

30 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 WO 2015/165422 A1 describe un procedimiento de tratamiento de un sujeto afligido con nefritis lúpica que comprende la administración al sujeto de una cantidad de ginsenósido M1 eficaz para tratar al sujeto. El uso de ginsenósido M1 para fabricar un medicamento para el tratamiento de nefritis lúpica en un sujeto que lo necesite.

40 En el documento WO 2015172746 A1 se proporciona un procedimiento de inhibición de fibrosis renal en un sujeto que lo necesite.

El documento TW 200 930 387 desvela una composición farmacéutica que comprende un extracto de *ginseng* que incluye ginsenósidos para el principio activo de nefropatía por ácido aristolóquico.

En el documento TW 200 930 388 se desvela una composición farmacéutica que comprende un extracto de *ginseng* que incluye ginsenósidos como principios activos del tratamiento de nefropatía inducida por cisplatino.

Breve resumen de la invención

45 En la presente invención, se ha descubierto de manera inesperada que el ginsenósido M1 es eficaz en la mejora de los síntomas de nefropatía por IgA (NIgA). Por lo tanto, la presente invención proporciona una nueva estrategia para el tratamiento de NIgA en un sujeto.

50 En particular, la presente invención proporciona ginsenósido M1 para su uso en el tratamiento de nefropatía por IgA (NIgA), en la que el ginsenósido M1 se usa en una cantidad eficaz para el sujeto.

De manera específica, el ginsenósido M1 de la presente invención es eficaz en la reducción de uno o más síntomas de NIgA en el sujeto, seleccionado entre el grupo que consiste en (1) en el glomérulo: proliferación celular intrínseca, incluyendo proliferación celular mesangial, formación de depósitos semilunares, infiltración de neutrófilos y esclerosis segmentaria; y (2) en el compartimento tubulointerstitial: inflamación intersticial (especialmente periglomerular) de leucocitos mononucleares, fibrosis, y atrofia tubular con cilindros proteináceos en el sujeto. 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 por vía parenteral o enteral.

En algunas realizaciones, el ginsenósido M1 es para su uso en el tratamiento de nefropatía por IgA (NIgA), en la que el ginsenósido M1 se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos conocidos en la materia para el tratamiento de NIgA, 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).

La presente invención también describe el uso de ginsenósido M1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de NIgA en un sujeto que lo necesite.

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:

La Fig. 1 muestra los efectos de LCHK168 sobre la proteína de orina. Los estudios de evolución temporal de los niveles de proteína de la orina (proporción de proteína de la orina frente a creatinina [Cr]). **p<0,005.

La Fig. 2 muestra el tratamiento con LCHK168 mejora la función renal en un modelo de ratones de nefropatía por IgA (NIgA) (A) Niveles de nitrógeno ureico en suero sanguíneo (NUS). (B) Niveles de creatinina sérica (Cr). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

La Fig. 3 demuestra que el tratamiento con LCHK168 mejora las características histopatológicas renales graves en el modelo de ratones de nefropatía por IgA (NIgA) (A) Evaluación histopatológica del riñón mediante tinción con H&E. Aumento original, 400X. (B) Puntuación del porcentaje de glomérulos afectados por el parámetro indicado. **p<0,01, ***p<0,005, #No detectable.

La Fig 4 muestra los efectos de LCHK168 sobre la infiltración de linfocitos T. En ratones con NIgA tratada con LCHK168, en comparación con los controles de la enfermedad tratados con vehículo y los controles normales. La tinción de los tejidos renales para (A) linfocitos T CD3+. (B) Puntuación de células teñidas en el glomérulo y en los periglomerulos. Aumento original, 400X. **p<0,01, ***p<0,005, #No detectable.

La Fig. 5 muestra los efectos de LCHK168 sobre la infiltración de monocitos/macrófagos. En ratones con NIgA tratada con LCHK168, en comparación con los controles de la enfermedad tratados con vehículo y los controles normales. La tinción de los tejidos renales para (A) monocitos/macrófagos F4/80+. (B) Puntuación de células teñidas en el glomérulo y en los periglomerulos. Aumento original, 400X. *p<0,05, ***p<0,005, #No detectable.

La Fig. 6 muestra los efectos de LCHK168 sobre la infiltración de linfocitos Th. En ratones con NIgA tratada con LCHK168, en comparación con los controles de la enfermedad tratados con vehículo y los controles normales. La tinción de los tejidos renales para (A) linfocitos T CD4+. (B) Puntuación de células teñidas en el glomérulo y en los periglomerulos. Aumento original, 400X. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005, #No detectable.

La Fig. 7 muestra los efectos de LCHK168 sobre la infiltración de linfocitos Tc. En ratones con NIgA tratada con LCHK168, en comparación con los controles de la enfermedad tratados con vehículo y los controles normales. La tinción de los tejidos renales para (A) linfocitos T CD8+. (B) Puntuación de células teñidas en el glomérulo y en los periglomerulos. Aumento original, 400X. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005, #No detectable.

La Fig. 8 muestra los efectos de LCHK168 sobre la infiltración de células dendríticas. En ratones con NIgA tratada con LCHK168, en comparación con los controles de la enfermedad tratados con vehículo y los controles normales. La tinción de los tejidos renales para (A) linfocitos T CD11c+. (B) Puntuación de células teñidas en el glomérulo y en los periglomerulos. Aumento original, 400X. **p<0,01, ***p<0,005, #No detectable.

La Fig. 9 muestra los efectos de LCHK168 sobre la expresión génica relacionada con la fibrosis renal. En ratones con NIgA tratada con LCHK168, en comparación con los controles de la enfermedad tratados con vehículo y los controles normales. (A) Se detectó colágeno IV mediante tinción inmunohistoquímica del tejido renal en el día 14 y 28 del tratamiento. (B) Puntuación de células teñidas en el glomérulo y en los periglomerulos. Aumento original, 400X. **p<0,01, ***p<0,005.

La Fig. 10 muestra que LCHK168 protege frente a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los riñones de ratones con nefropatía por IgA (NIgA). El tejido de los riñones de ratones con NIgA tratados con LCHK168, en comparación con los controles de la enfermedad tratados con vehículo y los controles normales se evaluaron en el día 14 y en el día 28 del tratamiento en sus niveles de anión superóxido (evaluados como

unidades relativas de luminiscencia [URL]/5 minutos/mg de peso seco). * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

La Fig. 11 muestra el que el análisis de citometría de flujo del tratamiento con LCHK168 modula la inmunidad celular en ratones con nefropatía por IgA (NIgA). En ratones con NIgA tratados con LCHK168, en comparación con los controles de enfermedad tratados por vehículo y los controles normales, la respuesta inmunitaria en el día 14 y 28 del tratamiento se evaluó como el grado de activación de linfocitos T CD4+ de memoria. * $p < 0,05$.

La Fig. 12 muestra que el tratamiento con LCHK168 reduce los niveles renales de ARNm de TLR2 en nefropatía por IgA (NIgA). En ratones con NIgA tratados con LCHK168, en comparación con controles de enfermedad tratados con vehículo y controles normales, los niveles de ARNm de TLR2 (en relación con GADPH) se determinaron mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real del tejido del riñón. * $p < 0,05$.

La Fig. 13 muestra que LCHK168 atenuó la maduración de las CD de IgA-Complejo inmunitario (IgA-Ci). En CD con IgA-Ci tratado con LCHK168, en comparación con IgA-Ci y una simulación, se determinaron los niveles de expresión de (A) CD40; (B) CD80; y (C) CD86 mediante citometría de flujo. (D) El porcentaje de población de células con células dendríticas CD40, CD80 y CD86.

La Fig. 14 muestra que la activación de NLRP3 en CD estimuladas con IgA-Ci se redujo mediante LCHK168. En CD con IgA-Ci tratado con LCHK168, en comparación con IgA-Ci y una simulación. Análisis por transferencia de Western para (A) NLRP3 con p-actina como el control de carga y (B) análisis semicuantitativo para NLRP3.

Descripción detallada de la invención

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.

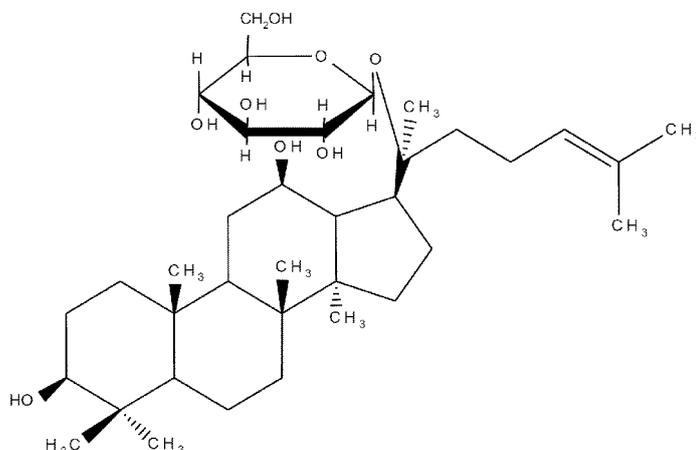
Los artículos “un” y “una” se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

En la presente invención, se descubrió de manera inesperada que el ginsenósido M1 puede evitar el desarrollo de NIgA administrándolo a ratones con NIgA. En particular, se ha descubierto que los animales con NIgA presentan diversos síntomas que incluyen (1) en el glomérulo: proliferación celular intrínseca incluyendo proliferación celular mesangial, formación de depósitos semilunares, infiltración de neutrófilos, esclerosis segmentaria y (2) en el compartimento tubulointerstitial: inflamación intersticial (especialmente periglomerular) de leucocitos mononucleares, fibrosis, y atrofia tubular con cilindros proteináceos, o proteinuria o hematuria o niveles elevados de nitrógeno ureico de suero o niveles de creatinina en suero.

Por lo tanto, la presente invención proporciona ginsenósido M1 para su uso en el tratamiento de nefropatía por IgA (NIgA), en la que el ginsenósido M1 se usa en una cantidad eficaz para un sujeto. La presente invención también describe el uso de ginsenósido M1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de NIgA en un sujeto que lo necesite.

El ginsenósido de la invención es eficaz en la mejora de uno cualquiera de estos síntomas en pacientes con NIgA.

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.

5 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.

10 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). Específicamente, el sujeto es uno afligido con NIgA.

15 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.

20 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 NIgA 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 incluyendo proliferación celular mesangial, formación de depósitos semilunares, infiltración de neutrófilos y esclerosis segmentaria; y (2) en el compartimento tubulointerstitial: inflamación intersticial (especialmente periglomerular) de leucocitos mononucleares, fibrosis, y atrofia tubular con cilindros proteináceos, o proteinuria o hematuria o niveles elevados de nitrógeno ureico de suero o niveles de creatinina en suero, en un sujeto que tiene NIgA. 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.

25 De acuerdo con la presente invención, se puede usar ginsenósido M1 como un principio activo para el tratamiento de NIgA. 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.

30 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 arábiga, 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.

- 5 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.

- 15 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 NIgA. De manera específica, el ginsenósido M1 o las composiciones que comprenden ginsenósido M1 como el principio activo se pueden administrar a individuos con NIgA o a individuos en riesgo de adquirir NIgA para prevenir la aparición de la enfermedad o mejorar los síntomas o retrasar el deterioro de los síntomas.

- 20 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.

30 **Ejemplo**

1. Materiales y procedimientos

1.1 Modelo animal y protocolo experimental

- 35 Se obtuvieron ratones deficientes en linfocitos B de la Academia Sinica (Profesor John T. Kung, Institute of Molecular Biology, Taipei, Taiwan) y se mantuvieron en el centro de animales del National Defense Medical Center (Taipei, Taiwan). Se indujo la NIgA mediante inyección diaria de anticuerpos IgA antifosforilcolina purificados y antígeno de polisacárido C neumocócico (PnC) [14]. Todos los experimentos con animales se realizaron con la aprobación del Institutional Animal Care and Use Committee of The National Defense Medical Center, y cumplieron con la guía NIH para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio.

1.2 Ginsenósido M1

- 40 El Ginsenósido M1, 20-O-β-D-glucopiranosil-20(S)-protopanaxadiol (llamado LCHK168 en lo sucesivo) se preparó mediante procedimientos conocidos en la materia, tal como los descritos en la Solicitud de Patente de Taiwan N.º 094116005 (1280982) y la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 7.932.057. A los ratones se les trató diariamente con 60 mg/kg de LCHK168 o con el vehículo, mediante administración oral por sonda gástrica durante el experimento, dando la primera dosis 2 días antes de la inducción de la enfermedad.

1.3 Análisis de proteína de orina y de función renal

- 45 El peso corporal se midió de forma semanal. Las muestras de orina se recolectaron en jaulas metabólicas cada semana y se determinó la proteína de la orina. Se recolectaron muestras de suero en los días 14 y 28 para medir los niveles séricos de nitrógeno ureico en sangre (NUS) y de creatinina (Cr). Para la histopatología renal, se fijaron los tejidos en formalina tamponada al 10 % y se embebieron en parafina, y después se prepararon secciones (3 mm) y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). El porcentaje de glomérulos que muestra la proliferación, la infiltración de los neutrófilos, la esclerosis o la inflamación periglomerular se determinó mediante recuento de 50 glomérulos muestreados de manera aleatoria mediante microscopía de luz a un aumento de 400X.

1.4 Evaluación patológica

Para la IHQ, las secciones de tejido fijadas con formalina y embebidas en parafina o las secciones congeladas se incubaron toda la noche a 4 °C con anticuerpos frente a CD3, F4/80, CD4, CD8, CD11c, colágeno IV, diluidos en tampón de dilución de anticuerpos DAKO (DAKO), y después, durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (DAKO) en el mismo tampón; en el caso de los anticuerpos conjugados con HRP, también se añadió DAB (DAKO). Se usó la hematoxilina para hacer una contratinción de los núcleos. Se hizo un recuento de células positivas a un aumento de 400X en 20 glomérulos consecutivos o en 20 campos del compartimento del túbulo intersticial seleccionados de manera aleatoria en la zona cortical mediante el programa informático de análisis cuantitativo de imágenes Pax-It.

1.5 Medición de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Para medir los niveles de ROS en tejido renal, las muestras se incubaron a temperatura ambiente con tampón Krebs-Hepes que contiene lucigenina 1,25 mM (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) como sustrato y se midieron recuentos de luminiscencia por duplicado a intervalos de 15 segundos en un lector de microplaca de multimarcaje (Hidex). La actividad de ROS se expresó como unidades relativas de luminiscencia (URL) por 15 minutos por miligramo de peso seco del órgano (es decir, URL/15 min/mg) o como URL/15 min/ml.

1.6 Citometría de flujo

Los esplenocitos de los ratones se trataron con cloruro de amonio tamponado con Tris para eliminar los eritrocitos, se lavaron y se resuspendieron en medio RPMI1640 suplementado con suero bovino fetal al 10 %, tampón Hepes, L-glutamina, y penicilina/estreptomicina. Las células se tiñeron por triplicado para los subtipos de linfocitos T usando anticuerpos anti-CD44 de ratón conjugado con FITC, anti-CD62 de ratón conjugado con ficoeritrina y anti-CD4 de ratón conjugado con alofocianina y se analizaron usando un FACSCalibur.

La maduración de las células dendríticas (CD) se determinó mediante la regulación positiva de la expresión de moléculas coestimuladoras. Las células se trataron con IgA-CI, LCHK168 (1,2^μM) y se tiñeron con mAb específicos para CD40, CD80 y CD86 de ratón y después se analizaron mediante citometría de flujo.

1.7 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en tiempo real

El ARN de la corteza renal se extrajo usando el reactivo TRIzol de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y la RT-PCR se usó para medir la expresión génica del TLR2. Se usaron los siguientes cebadores: para TLR2, 5'-GTCTCT GCGAC- CTAGAAGTGGA -3' (SEQ ID NO: 1) y 5'-CGGAGGGAATAGAGGTGAAAGA-3' (SEQ ID NO: 2) y para GAPDH, 5'- TCCGCCCTTCTGCCGATG-3' (SEQ ID NO: 3) y 5'-ACGGAAGGCCATGCCAGTGA-3' (SEQ ID NO: 4). La cuantificación en tiempo real se realizó usando un sistema Applied Biosystem de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las amplificaciones se normalizaron a los valores para GARDH usando el procedimiento $2^{-\Delta Ct}$.

1.8 Análisis por transferencia de Western

Se dejó correr cada una de las proteínas sobre un gel SDS-PAGE al 8 % y se electrotransferieron las proteínas sobre una membrana de difluoruro de polivinilideno que después se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en tampón de bloqueo (solución salina tamponada con Tris que contiene leche desnatada al 5 %) y después durante toda la noche a 4 °C con anticuerpos de conejo frente a NLRP3 o p-actina. Después del lavado, se incubó la membrana durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpo anti-IgG de conejo en cabra conjugado con HRP en el mismo tampón; después se detectó el anticuerpo unido usando UVP Biospectrum,

1.9 Análisis estadístico

Los valores son las medias \pm EE. La comparación entre dos grupos se realizó usando el test de la t de Student. Se consideró un p-valor de <0,05 como estadísticamente significativo.

2. Resultados

2.1 Reducción significativa de proteinuria y hematuria y protección de la función renal en ratones NlgA mediante ginsenosido M1

Los ratones de control de la enfermedad, es decir, los ratones NlgA tratados con vehículo (ratones de NlgA de control), mostraron elevados niveles de proteína de la orina desde el día 14 de la inducción de la enfermedad, y estos continuaron en aumento hasta la finalización del estudio el día 28 (Fig. 1). Este efecto se inhibió notablemente mediante (NlgA+LCHK168), aunque los ratones aún presentaron una proteinuria moderada en comparación con los controles no tratados normales. Además, en comparación con los ratones de control de la enfermedad, que mostraron niveles séricos significativamente elevados de NUS (Fig. 2A) y Cr (Fig. 2B) en el día 28, los ratones NlgA+LCHK168 mostraron una función renal mucho mejor. EL día 14 no hubo diferencias significativas de los niveles séricos de NUS y Cr entre los ratones de control de enfermedad, los NlgA+LCHK168 y los ratones de control normal.

2.2 Prevención de características histopatológicas renales graves en ratones tratados con LCHK168

Tal como se muestra en la Fig. 3, el día 28, los ratones de control de la enfermedad NIgA mostraron una proliferación difusa asociada con depósitos semilunares focales pero típicos; esclerosis segmentaria y/o infiltración de neutrófilos en el glomérulo, infiltración periglomerular intensa de leucocitos mononucleares y atrofia tubular dispersa asociada con cilindros proteináceos en el compartimento tubulointersticial, pero esta lesión renal se inhibió de manera significativa mediante la administración de LCHK168.

2.3 Inhibición de inflamación renal y fibrosis en ratones tratados con LCHK168

Además, los presentes inventores realizaron la IHQ para evaluar los fenotipos y la distribución de los leucocitos mononucleares que se infiltraron en el riñón de los ratones. La tinción focal pero intensa para los linfocitos T CD3+ (Fig. 4), monocitos/macrófagos F4/80+ (Fig. 5), linfocitos T CD4+ (Fig. 6), linfocitos T CD8+ (Fig. 7), células dendríticas CD11c+ (Fig. 8) y colágeno IV (Fig. 9) se vio en el tejido intersticial renal, principalmente en un patrón periglomerular, en ratones de control de la enfermedad en el día 28 en comparación con los controles normales, aunque solo se vieron en el riñón muy pocas células inflamatorias y fibrosis en el día 14. Por el contrario, los ratones NIgA + LCHK168 mostraron una infiltración significativamente reducida de estas células inflamatorias y de fibrosis en el riñón en comparación con los ratones de control de la enfermedad en el día 28 (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005).

2.4 Inhibición de la producción de ROS con LCHK168

Las ROS se consideran el principal factor perjudicial que lleva a una aceleración y a una progresión en diversos tipos de trastornos renales, incluyendo NIgA. Por lo tanto, los presentes inventores midieron los niveles de ROS de forma sistémica en tejidos renales. Los ratones de control de la enfermedad mostraron niveles elevados de ROS en tejidos renales (Fig. 10) en el día 28 en comparación con los controles normales. La administración de LCHK168 fundamentalmente inhibió el aumento en los niveles de ROS de tejidos renales en el día 14 e inhibió de manera sustancial el aumento en niveles de ROS en tejidos renales en el día 28 en comparación con los ratones de control de la enfermedad (*p<0,05, ***p<0,005).

2.5 Modulación de la inmunidad sistémica con LCHK168

Dado que la inmunidad mediada por células ha estado implicada durante mucho tiempo en la patogénesis de NIgA, los presentes inventores examinaron la activación de linfocitos T en esplenocitos mediante citometría de flujo. Tal como se muestra en la Fig. 11, se observó un evidente aumento en los linfocitos T CD4+ de memoria en ratones de control de la enfermedad en comparación con los controles normales. La administración de LCHK168 indujo una reducción significativa de los linfocitos T CD4+ de memoria en comparación con los ratones de control de la enfermedad (*p<0,05).

2.6 Inhibición de la expresión de TLR2 con LCHK168

Los investigadores han demostrado que los niveles de expresión de TLR2 se correlacionan con la inflamación renal y la fibrosis en NIgA. Por lo tanto, los presentes inventores midieron los niveles de ARNm de TLR2 en el riñón mediante RT-PCR en tiempo real (Fig. 12). En comparación con los ratones de control de NIgA, que mostraron niveles significativamente elevados de ARNm de TLR2 a los 28 días, los ratones en el grupo NIgA + LCHK168 tuvieron unos niveles de ARNm de TLR2 significativamente menores, aunque la diferencia a los 14 días no fue estadísticamente significativa (*p<0,05).

2.7 Inhibición de la maduración de las CD con LCHK168

La maduración es la etapa clave en la regulación de respuestas inmunitarias mediadas por CD. Para investigar el efecto de LCHK168 sobre la maduración de las CD, los presentes inventores examinaron los niveles de expresión de CD40, CD80 y CD86 en CD mediante citometría de flujo. Y se detectó la expresión del inflamasoma NLRP3 mediante análisis por transferencia de Western. La estimulación de IgA-CI en comparación con la simulación potenció los niveles de expresión de estas moléculas (Fig. 13). Además, las CD tratadas con LCHK168 mostraron una expresión de la proteína NLRP3 significativamente reducida (Fig. 14).

En resumen, el estudio de los presentes inventores demuestra que el ginsenosido M1 es eficaz en el tratamiento de NIgA y en la prevención del desarrollo de NIgA. En particular, los resultados muestran (1) la reducción de las características histopatológicas renales, (2) la prevención de la infiltración de linfocitos T y monocitos/macrófagos, (3) la prevención de fibrosis y la deposición de colágeno en los tejidos intersticiales renales, (4) la inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno, (5) la reducción sistémica de linfocitos T CD4+ de memoria, (6) la inhibición de la maduración de las células dendríticas y (7) la inhibición de la expresión del inflamasoma NLRP3 mediante el tratamiento con ginsenosido M1. Todos estos hallazgos sugieren que el ginsenosido M se puede desarrollar adicionalmente como candidato de nuevo fármaco para el tratamiento o la prevención de NIgA.

Referencias

1. D'Amico G. The commonest glomerulonephritis in the world: IgA nephropathy. *Q J Med.* 1987 Sep; 64(245): 709-27.
2. Julian BA, Waldo FB, Rifai A, Mestecky J. IgA nephropathy, the most common glomerulonephritis worldwide. A neglected disease in the United States? *Am J Med.* 1988 Jan;84(1): 129-32.
3. Berger J, Hinglais N. Intercapillary deposits of IgA-IgG. *J Urol Nephrol (Paris).* 1968 Sep; 74(9):694-5.
4. Ish M, Sar A, Lee D, Yilmaz S, Benediktsson H, Manns B, Hemmelgarn B. Histopathologic features aid in predicting risk for progression of IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010 Mar;5(3):425-30.
5. Fujimi-Hayashida A, Ueda S, Yamagishi S, Kaida Y, Ando R, Nakayama Y, Fukami K, Okuda S. Association of asymmetric dimethylarginine with severity of kidney injury and decline in kidney function in IgA nephropathy. *Am J Nephrol.* 2011;33(1):1-6
6. Coppo R, Camilla R, Amore A, Peruzzi L. Oxidative stress in IgA nephropathy. *Nephron Clin Pract.* 2010;116(3):c196-8, discussion c199.
7. Lai KN, Chan LY, Guo H, Tang SC, Leung JC. Additive effect of PPAR- γ agonist and ARB in treatment of experimental IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 2011 Feb;26(2):257-66.
8. Ohashi N1, Katsurada A, Miyata K, Satou R, Saito T, Urushihara M, Kobori H. Role of activated intrarenal reactive oxygen species and renin-angiotensin system in IgA nephropathy model mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009 Aug;36(8): 750-5.
9. Katafuchi R, Ikeda K, Mizumasa T, Tanaka H, Ando T, Yanase T, Masutani K, Kubo M, Fujimi S. Controlled, prospective trial of steroid treatment in IgA nephropathy: a limitation of low-dose prednisolone therapy. *Am J Kidney Dis.* 2003 May;41(5):972-83.
10. Pozzi C, Bolasco PG, Fogazzi GB, Andrulli S, Altieri P, Ponticelli C, Locatelli F. Corticosteroids in IgA nephropathy: a randomised controlled trial. *Lancet.* 1999 Mar 13;353(9156):883-7.
11. Shoji T, Nakanishi I, Suzuki A, Hayashi T, Togawa M, Okada N, Imai E, Hori M, Tsubakihara Y. Early treatment with corticosteroids ameliorates proteinuria, proliferative lesions, and mesangial phenotypic modulation in adult diffuse proliferative IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 2000 Feb;35(2):194-201.
12. Wakabayashi, C., Hasegawa, H., Murata, J. et al. The expression of in vivo anti-metastatic effect of ginseng protopanaxatriol saponins is mediated by their intestinal bacterial metabolites after oral administration. *J Trad. Med.*, 1997,(14):180-185
13. Suda, K., Murakami, K., Murata, J., et al.. An intestinal bacterial metabolite of ginseng protopanaxdiol saponins inhibits tumor-induced neovascularization. *J. Trad. Med.*, 2000, (17):144-150
14. Chao TK, Rifai A, Ka SM, Yang SM, Shui HA, Lin YF, Sytwu HK, Lee WH, Kung JT, Chen A. The endogenous immune response modulates the course of IgA-immune complex mediated nephropathy. *Kidney Int.* 2006 Jul; 70(2):283-97.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> LEE, Sheau-Long
- <120> USO DE GINSENÓSIDO M1 PARA EL TRATAMIENTO DE NEFROPATÍA POR IGA
- <130> WED0005WO
- <150> US 62/074,247
- <151> 07/11/2014
- <160>4
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador 1 de TLR 2
- <400> 1
- gtctctgcga cctagaagtg ga 22
- <210>2
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

ES 2 704 059 T3

<220>
<223> Cebador 2 de TLR2

<400>2
cggaggggaat agaggtgaaa ga 22

5 <210>3
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador 1 de GAPDH

<400> 3
tccgcccctt ctgccgatg 19

15 <210>4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador 2 de GAPDH

20 <400> 4
acggaaggcc atgccagtga 20

REIVINDICACIONES

1. Ginsenosido M1 para su uso en el tratamiento de nefropatía por IgA (NlgA), en el que el ginsenosido M1 se usa en una cantidad eficaz para un sujeto.
- 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 NlgA seleccionados del grupo que consiste en (1) en el glomérulo: proliferación celular intrínseca que incluye la proliferación celular mesangial, la formación de depósitos semilunares, infiltración de neutrófilos y la esclerosis segmentaria; y (2) en el compartimento tubulointerstitial: inflamación intersticial de leucocitos mononucleares, fibrosis, 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 es eficaz en la reducción de los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS), en la reducción sistémica de los linfocitos T CD4+ de memoria, la inhibición de la maduración de las células dendríticas y/o la inhibición de la expresión del inflamasoma NLRP3, en tejidos renales en el sujeto.
- 15 4. Ginsenosido M1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ginsenosido 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.
5. Ginsenosido M1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el ginsenosido M1 se administra mediante la vía parenteral o enteral.
- 20 6. 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 NlgA, seleccionado del grupo que consiste en corticosteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos citotóxicos, inmunosupresores y vasodilatadores.
7. Ginsenosido M1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6 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.
- 25 8. Ginsenosido M1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, en las que el ginsenosido M1 se usa en combinación con los procedimientos terapéuticos o medicamentos existentes.
9. Ginsenosido M1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los medicamentos existentes son corticosteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos citotóxicos, inmunosupresores o vasodilatadores.

30

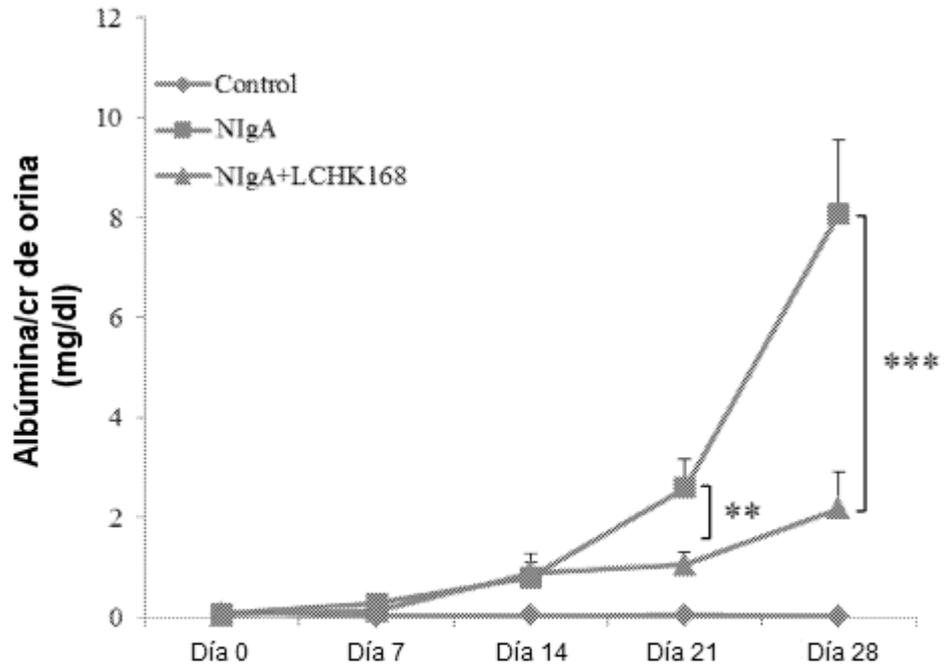


Fig. 1

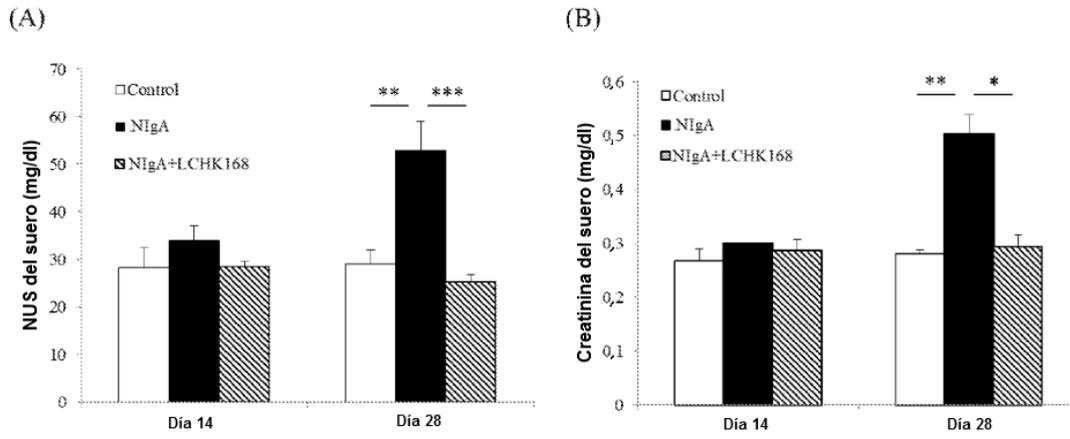


Fig. 2

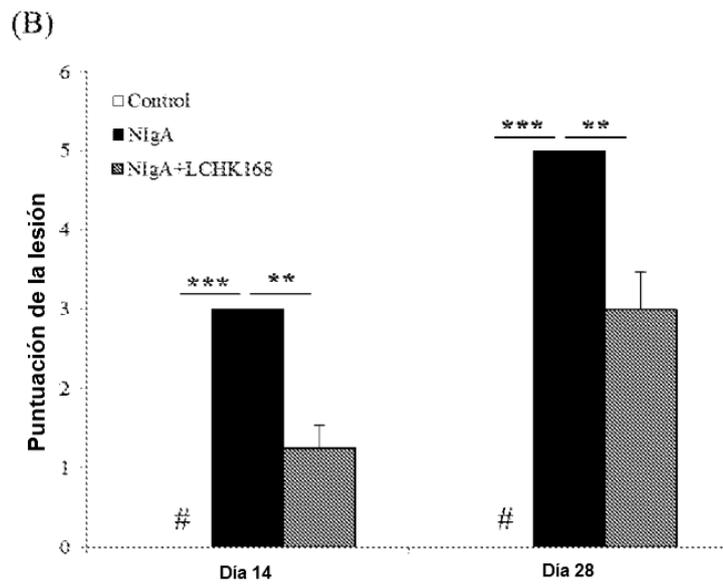
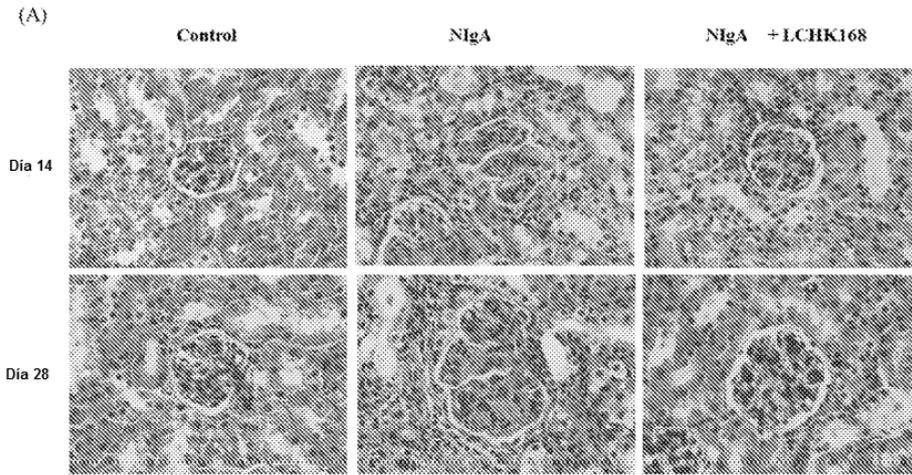


Fig. 3

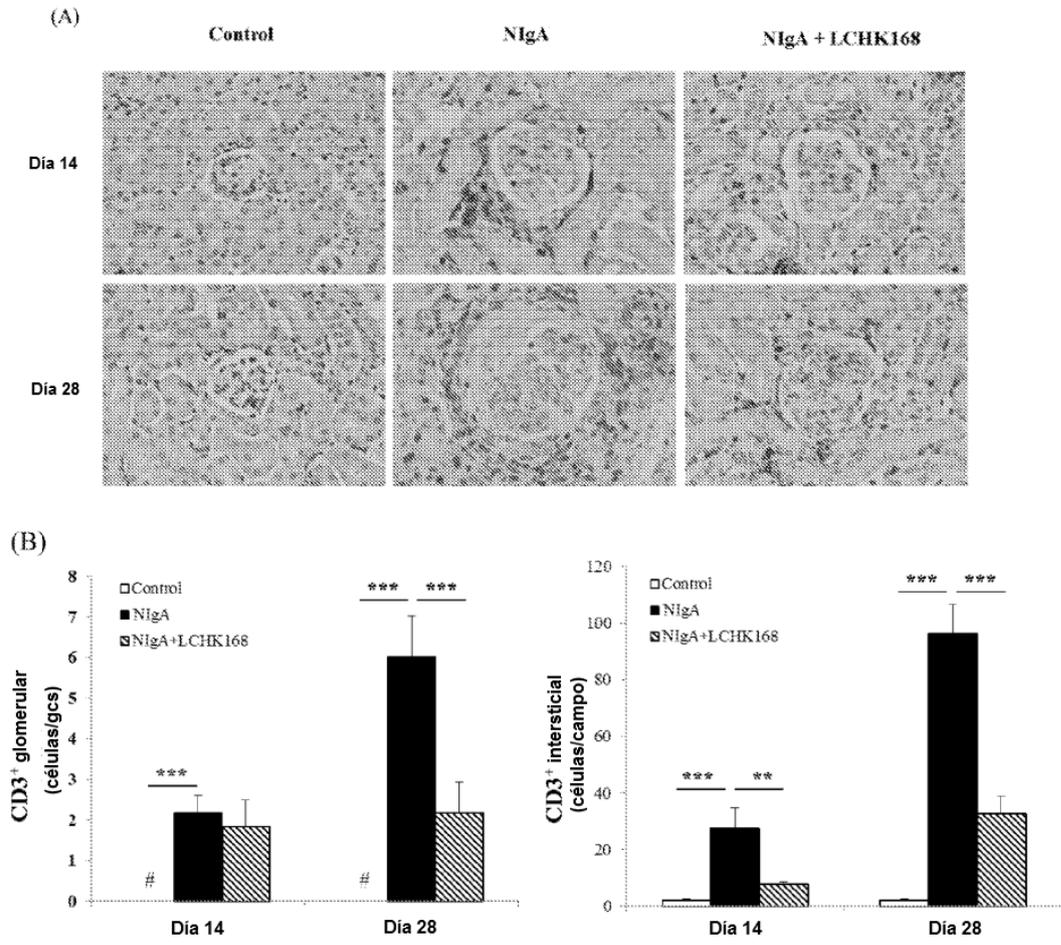


Fig.4

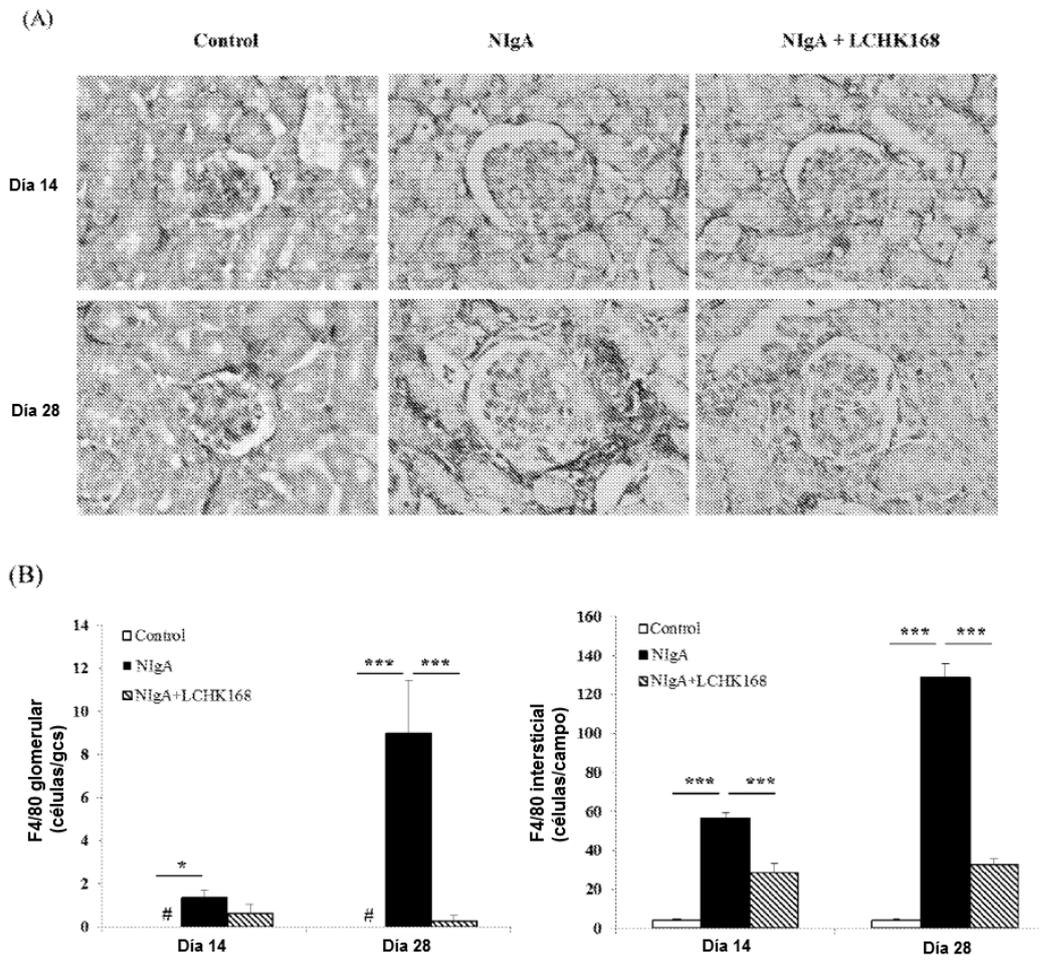


Fig.5

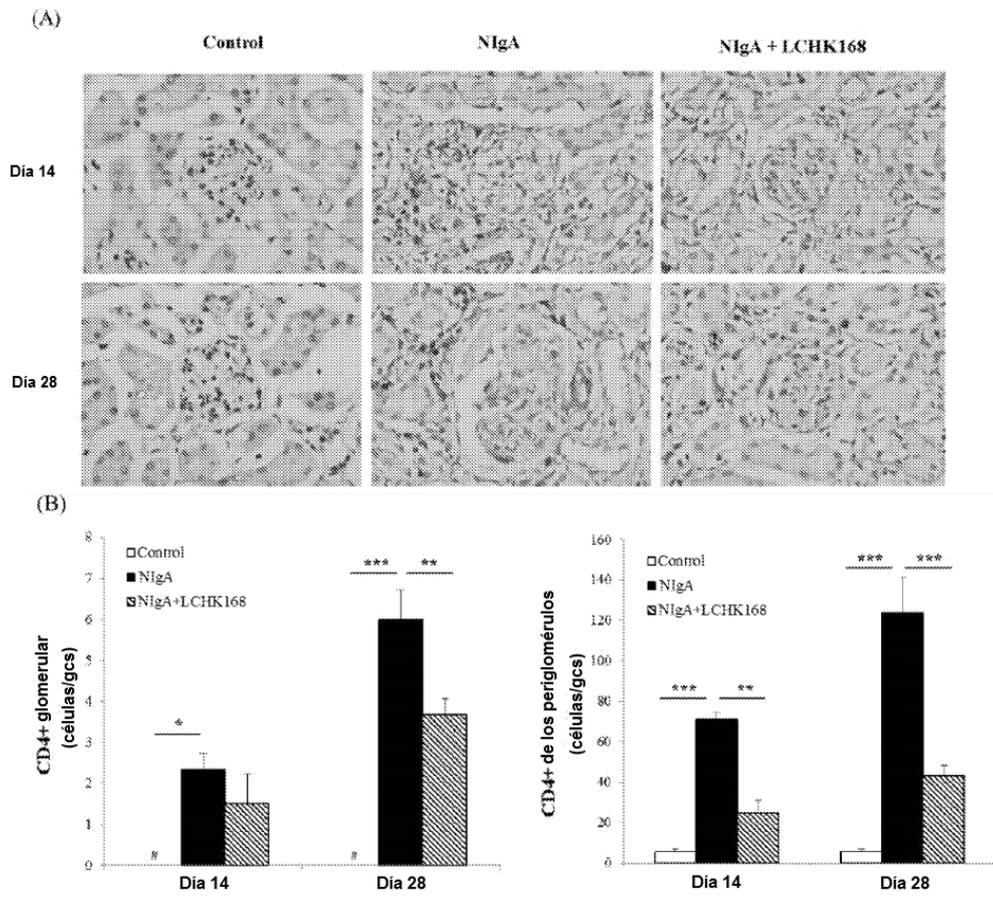


Fig.6

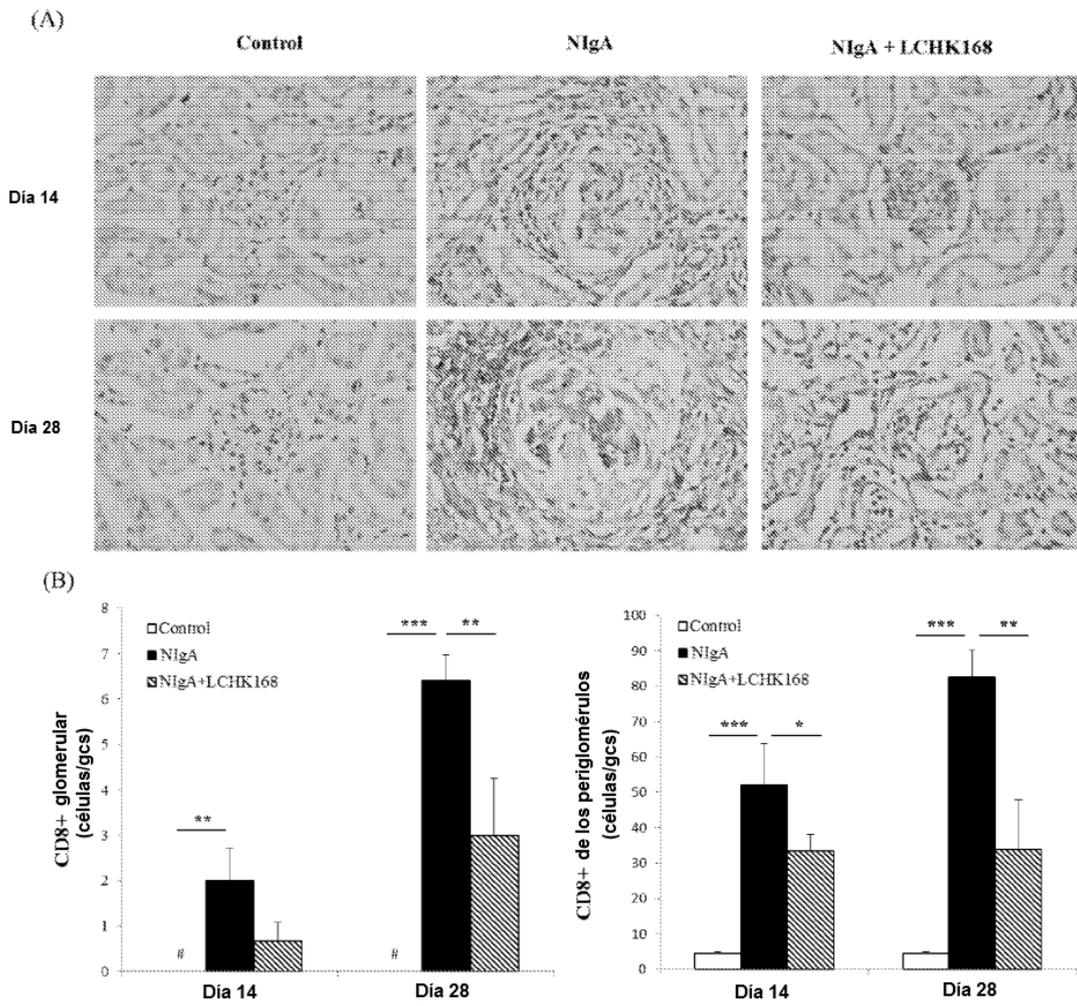


Fig.7

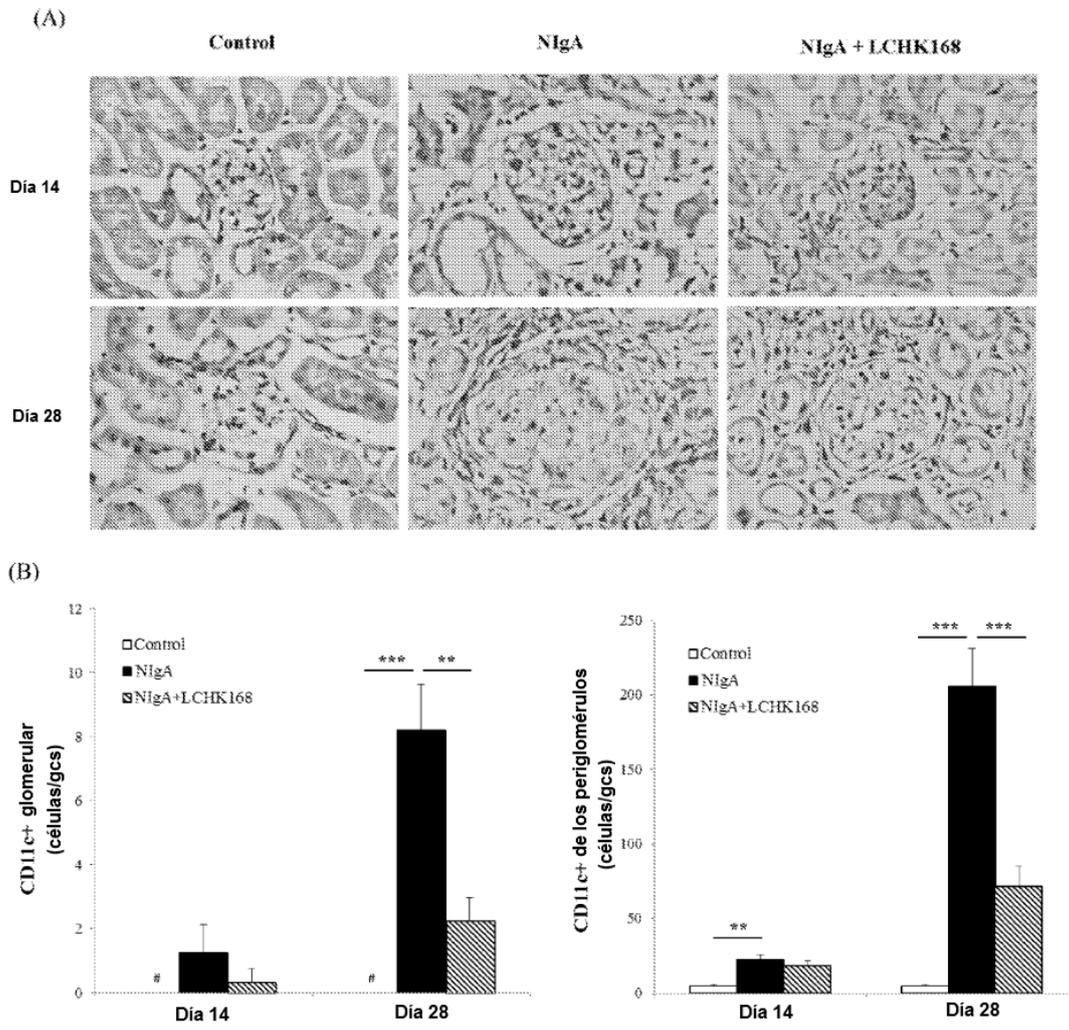


Fig.8

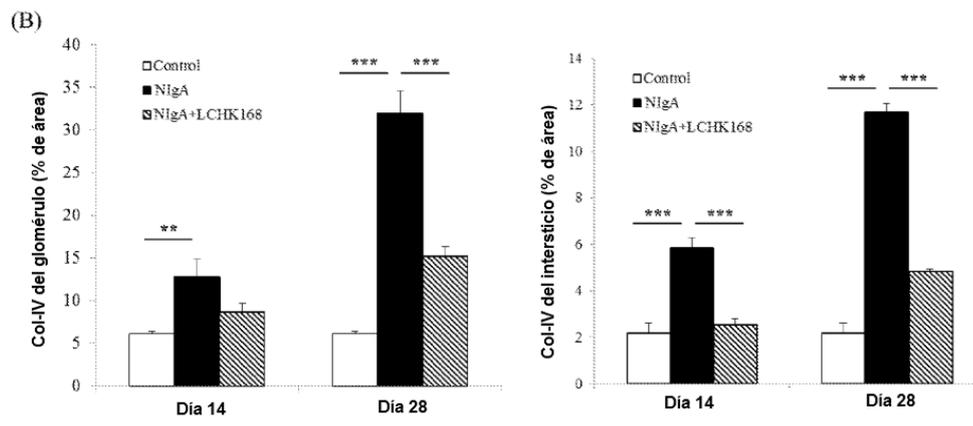
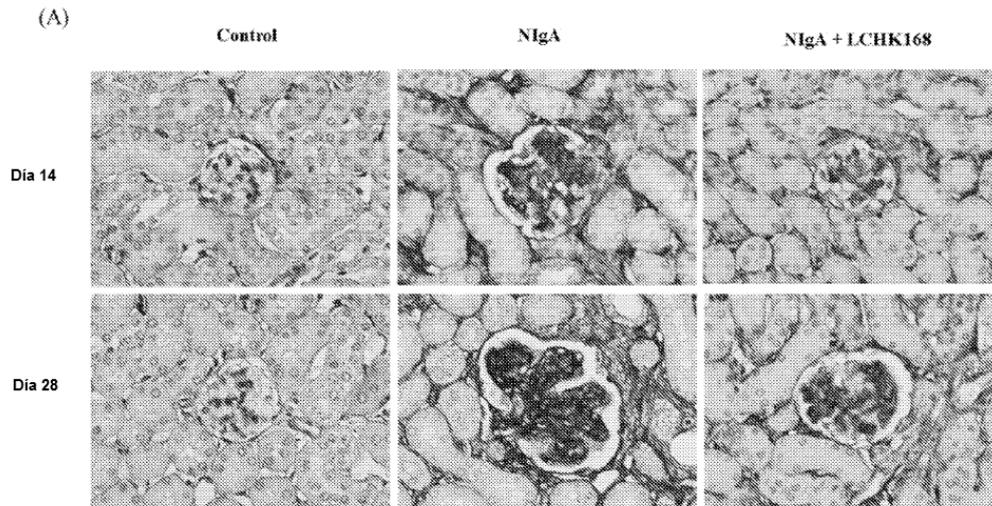


Fig.9

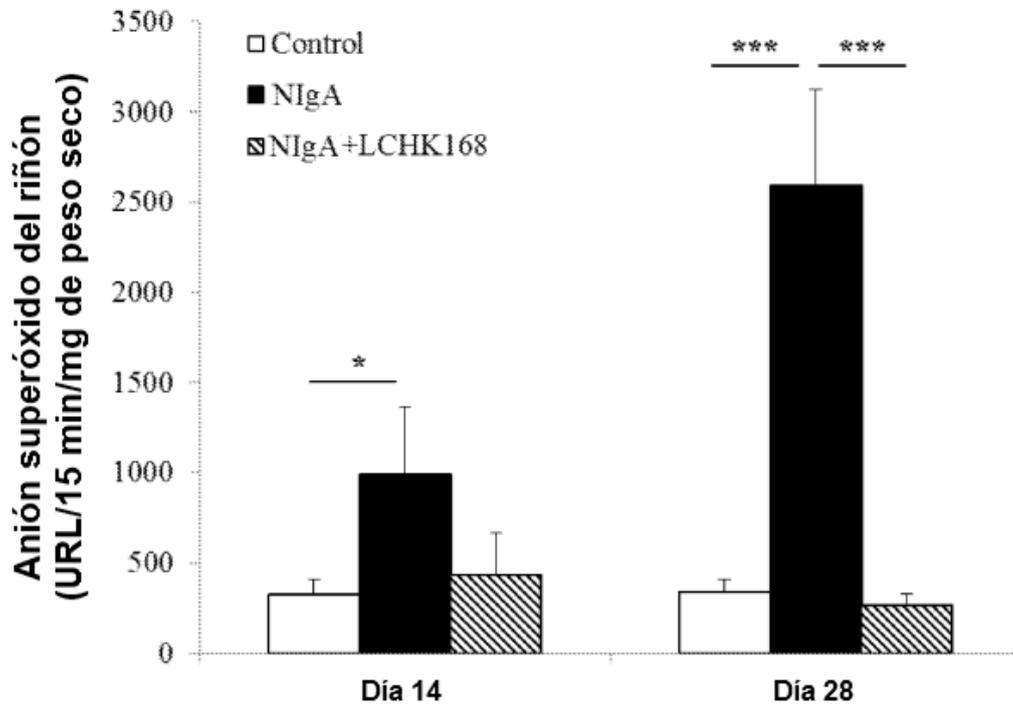


Fig.10

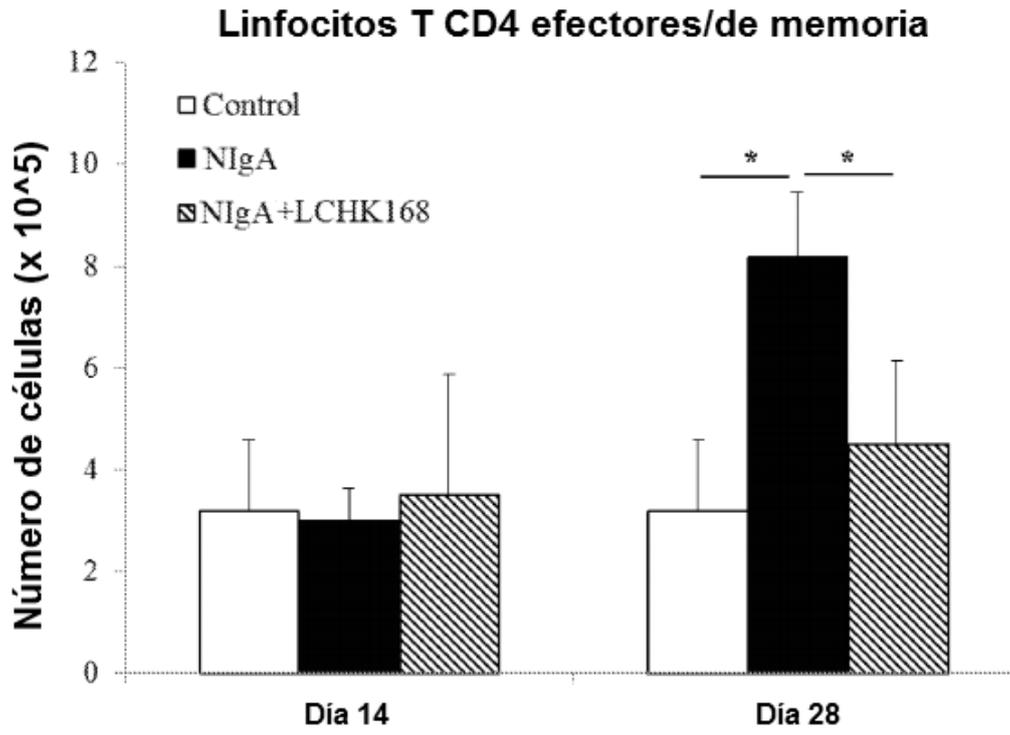


Fig.11

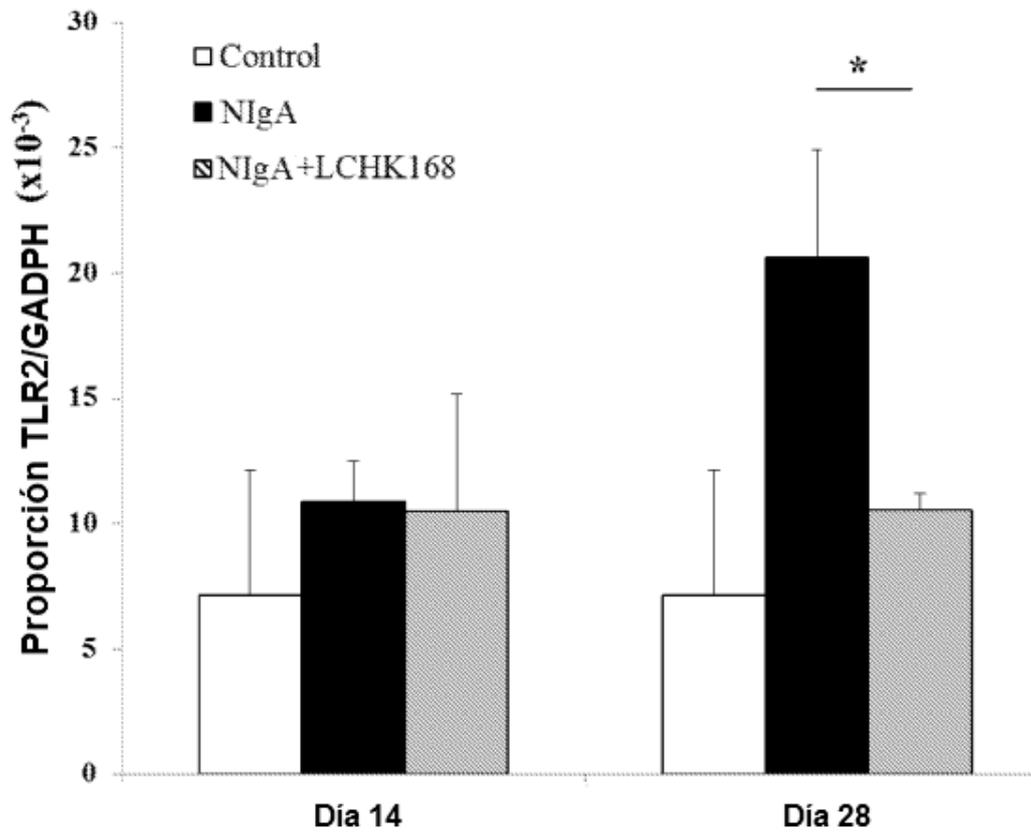


Fig.12

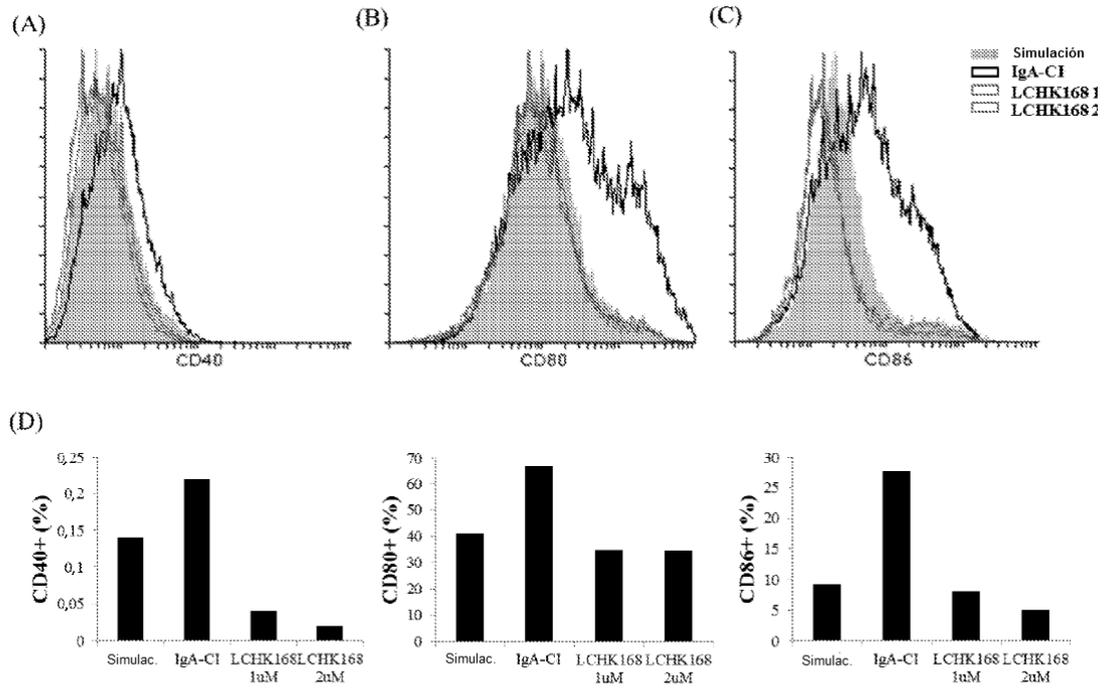


Fig.13

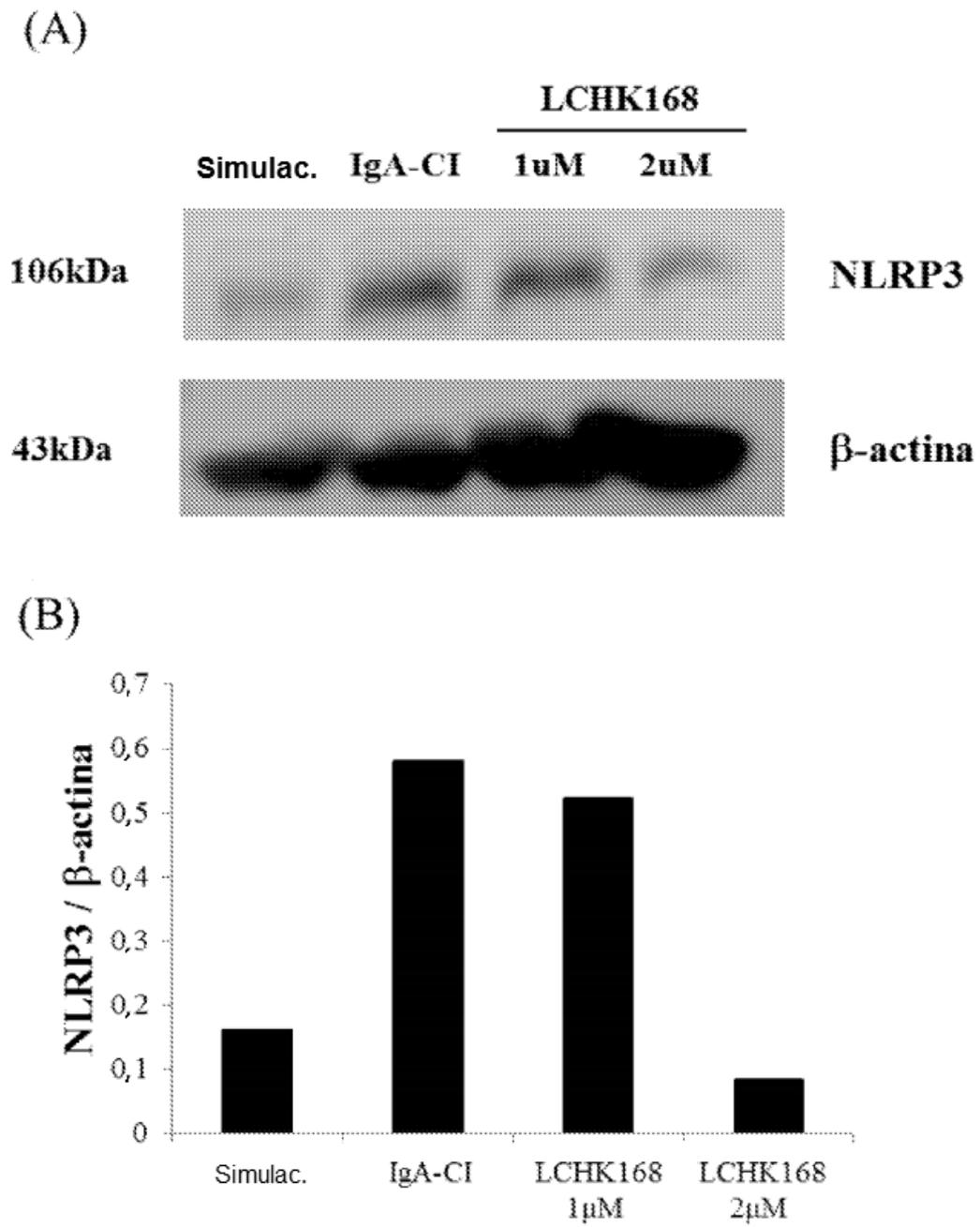


Fig.14