

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 203**

51 Int. Cl.:

A61K 31/704 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2015 PCT/CN2015/079156**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15172746**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2015 E 15793585 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3146062**

54 Título: **Uso del ginsenósido M1 para la inhibición de la fibrosis renal**

30 Prioridad:

16.05.2014 US 201461994486 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.01.2020

73 Titular/es:

**WELLHEAD BIOLOGICAL TECHNOLOGY CORP.
(100.0%)
2F., No.214 Gong 5th Rd., Longtan Dist.
Taoyuan City 32559, TW**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 739 203 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 del ginsenósido M1 para la inhibición de la fibrosis renal

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo uso del ginsenósido M1 para la inhibición de la fibrosis renal, particularmente la fibrosis intersticial.

Antecedentes de la invención

La fibrosis renal es el estadio final de las enfermedades renales. Las causas de la fibrosis renal incluyen la obstrucción ureteral.

La obstrucción ureteral es uno de los problemas más comunes al que se enfrentan los urólogos. La obstrucción ureteral produce el impedimento del flujo de orina por el uréter. Más comúnmente, la obstrucción se produce en la unión ureteropélvica. La expresión "uropatía obstructiva" en sentido más amplio se puede utilizar para indicar cualquier obstrucción del flujo urinario que se produzca entre la pelvis renal y la uretra, que produzca el desarrollo de hidronefrosis y la disfunción renal asociada. Los estrechamientos uretrales y la hipertrofia prostática benigna son un buen ejemplo. La incidencia de obstrucción ureteral unilateral (UJO) se ha registrado en 1/1.000 de adultos. Los cálculos ureterales son la causa más común, y la obstrucción aguda normalmente presenta un cólico renal significativo como el síntoma principal. Véase, por ejemplo, Docherty y col., evidence that inhibition of tubular cell apoptosis protects against renal damage and development of fibrosis following ureteric obstruction, Am J Physiol Renal Physiol. ene 2006; 290(1): F4-13. Dong Wang y col. Describe el efecto de un monómero útil en el ginseng para la producción de fibroblastos y la expresión de TGF- β (Wang Dong y col.: "The effect of utility monomer in ginseng to the growth and transforming growth factor-beta expression of renal fibroblast cell", JOURNAL OF ZHEJIANG CHINESE MEDICAL UNIVERSITY, Vol. 36, no. 8, 31 de agosto de 2012 (31.08.2012), páginas 917-920).

Al principio de la UJO, el intersticio se infiltra con monocitos, que se activan "clásicamente" en macrófagos que liberan citocinas tales como TGF- β 1 y el factor- α de necrosis tumoral (TNF- α). A su vez, el TGF- β 1 promueve una respuesta fenotípica de células epiteliales tubulares que se someten a apoptosis (dando lugar a atrofia tubular) o se someten a transición mesenquimática epitelial (EMT), que hace que los fibroblastos migren al intersticio. La angiotensina II (ANG II) producida por la activación de los monocitos, estimula la producción del factor nuclear- κ B (NF- κ B), que da lugar al reclutamiento de más macrófagos, así como a la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS), que agrava la lesión tubular renal. Por el contrario, los macrófagos activados de manera alternativa pueden aumentar la supervivencia y proliferación celular tubular. Las células endoteliales pueden someterse a transición endotelial-mesenquimática (EndMT) o apoptosis, que da lugar a pérdida de capilaridad e isquemia e hipoxia renal secundaria. Los pericitos residentes y las células madre hematopoyéticas también se pueden diferenciar en fibroblastos. Bajo el estímulo de las citocinas, tal como el TGF- β 1 producido por los macrófagos u otras células, los fibroblastos sintetizan fibras de estrés y se somete a una diferenciación adicional para dar lugar a miofibroblastos. Los miofibroblastos son contráctiles y aumentan el depósito de matriz extracelular (ECM), dando lugar a fibrosis intersticial progresiva. Este proceso da lugar finalmente a fibrosis renal progresiva y fallo renal irreversible. Véase, por ejemplo, Chevalier y col., Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy, Kidney Int. 2009 jun; 75(11): 1145-52.

Los ginsenósidos, los principios activos del ginseng, se conocen por tener una variedad de actividades farmacológicas, por ejemplo, actividades antitumorales, antidiabéticos, antifatiga, antialérgicas y antioxidantes. Los ginsenósidos comparten una estructura básica, compuesta de un núcleo esteroide gonano que tiene 17 átomos de carbono dispuestos en cuatro anillos. Los ginsenósidos se metabolizan en el cuerpo, y varios estudios recientes sugieren que los metabolitos del ginsenósido, más que los ginsenósidos de origen natural se absorben fácilmente en el cuerpo y actúan como principios activos. Entre estos, el ginsenósido M1 se conoce como un metabolito de los ginsenósidos tipo protopanaxadiol mediante la ruta gipenósido por las bacterias del intestino humano. Hasta ahora, ninguna referencia de la técnica anterior informa del efecto del ginsenósido M1 en el tratamiento de la fibrosis renal.

Breve resumen de la invención

En la presente invención, se descubrió inesperadamente que el ginsenósido M1 es eficaz en la inhibición de la fibrosis renal. Por lo tanto, la presente invención proporciona una nueva estrategia para el tratamiento o prevención de la fibrosis renal en un sujeto.

En particular, la presente invención proporciona un ginsenósido M1 para su uso en un procedimiento para la inhibición/tratamiento de la fibrosis renal en un sujeto que necesita del mismo, en el que el ginsenósido M1 se utiliza en una cantidad eficaz de M1 para el sujeto.

En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente con una nefropatía obstructiva.

En algunas realizaciones, el ginsenósido M1 de la invención es eficaz para la reducción o alivio de uno o más síntomas o afecciones, incluyendo, pero sin limitarse a, inflamación leucocítica mononuclear, dilatación tubular, atrofia tubular,

proliferación de células epiteliales tubulares, proliferación de células epiteliales tubulares, activación de fibroblastos o miofibroblastos y deposición de colágenos (por ejemplo, III o IV), particularmente en el compartimento tubulointersticial del sujeto.

5 En algunas realizaciones, el ginsenosido M1 de la invención es eficaz en la reducción o alivio de la infiltración leucocítica mononuclear o fibrosis en el intersticio renal del sujeto.

En algunas realizaciones, el ginsenosido M1 se administra por vía parenteral o entérica.

En algunas realizaciones, el ginsenosido M1 se administra antes o en el momento de la aparición de la fibrosis renal.

En algunas realizaciones, el ginsenosido M1 se administra después de la aparición de la fibrosis renal.

10 También se proporciona el ginsenosido M1 para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la fibrosis renal.

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

Breve descripción de los dibujos

15 Con fines de ilustración de la invención, se muestran realizaciones en los dibujos. En los dibujos:

La Fig. 1 muestra el establecimiento de UUO en un modelo animal, incluyendo (A) el procedimiento experimental, (B) el procedimiento quirúrgico del modelo animal de UUO en el que a la izquierda está el riñón enfermo tras la ligadura del uréter y a la derecha está el riñón normal sin ligadura del uréter.

20 La Fig. 2 muestra la evaluación histopatológica del riñón mediante tinción con H/E en la que las flechas indican los túbulos dilatados. (A) tinción con H/E para la evaluación histopatológica. "#" indica el túbulo renal dilatado, el asterisco indica los monocitos y "*" indica la atrofia del túbulo renal. La magnificación original era de x400 para la histopatología. (B) muestra la puntuación semicuantitativa (TIS) de la lesión tubulointersticial. Las columnas blanca, negra y gris representan los ratones de control normales, los ratones de control enfermos y los ratones LCHK168+UUO, respectivamente. *** $p < 0,005$.

25 La Fig. 3 muestra la apoptosis celular renal y la evaluación de la proliferación, incluyendo (A) detección de PCNA mediante tinción inmunohistoquímica en la que las flechas indican las células teñidas positivamente, y (B) los resultados semicuantitativos. La magnificación original es 3400. Las columnas blanca, negra y gris representan los ratones de control normales, los ratones de control enfermos y los ratones LCHK168+UUO, respectivamente. *** $p < 0,005$.

30 La Fig. 4 muestra la evaluación de la expresión de fibrosis, incluyendo (A) la expresión de colágenos fibróticos en el tejido renal por tinción tricromática de Masson, (B) expresión de la α -actina de músculo liso (α -SMA) del tejido renal por tinción inmunohistoquímica, (C) expresión de colágeno III en los tejidos renales por tinción inmunohistoquímica, (D) expresión de colágeno IV en los tejidos renales por tinción inmunohistoquímica, en la que las flechas indican las células teñidas positivamente, y (E) los resultados semicuantitativos. La magnificación original es 3400. Las columnas blanca, negra y gris representan los ratones de control normales, los ratones de control enfermos y los ratones LCHK168+UUO, respectivamente. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

35 La Fig. 5 muestra (A) la expresión de NF- κ B en los tejidos renales por tinción inmunohistoquímica, en la que las flechas indican las células teñidas positivamente, y (B) los resultados semicuantitativos. La magnificación original es 3400. Las columnas blanca, negra y gris representan los ratones de control normales, los ratones de control enfermos y los ratones LCHK168+UUO, respectivamente. *** $p < 0,005$.

40 La Fig. 6 muestra la infiltración de leucocitos mononucleares en los tejidos renales, incluyendo la detección de (A) monocitos/macrófagos F4/80⁺ y (B) linfocitos T CD3⁺ por tinción inmunohistoquímica, en la que las flechas indican las células teñidas positivamente, y (C) los resultados semicuantitativos. La magnificación original es 3400. Las columnas blanca, negra y gris representan los ratones de control normales, los ratones de control enfermos y los ratones LCHK168+UUO, respectivamente. *** $p < 0,005$.

45 La Fig. 7 muestra que el LCHK168 inhibe el nivel de expresión de MCP-1, TNF- α e IL-1 β en la pelvis renal. (A) MCP-1, (B) TNF- α , y (C) IL-1 β se detectan en las muestras de orina mediante un ELISA. Las columnas blanca, negra y gris representan los ratones de control normales, los ratones de control enfermos y los ratones LCHK168+UUO, respectivamente. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

50 La Fig. 8 muestra la evaluación de la activación de la inmunidad celular, incluyendo la detección de (A) linfocitos T CD3⁺ CD69⁺ y (B) linfocitos T CD19⁺ CD69⁺ mediante citometría de flujo. Las columnas blanca, negra y gris representan los ratones de control normales, los ratones de control enfermos y los ratones LCHK168+UUO, respectivamente.

55 La Fig. 9 muestra la evaluación de la activación de las células madre hematopoyéticas, incluyendo la detección de (A) células madre CD34⁺ y (B) células madre hematopoyéticas Sca-1⁺ mediante citometría de flujo. Las columnas blanca, negra y gris representan los ratones de control normales, los ratones de control enfermos y los ratones LCHK168+UUO, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

A menos de que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Como se utiliza en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados adscritos a menos de que se especifique otra cosa.

- 5 Los artículos "un" y "una" se utilizan en el presente documento para referirse 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.

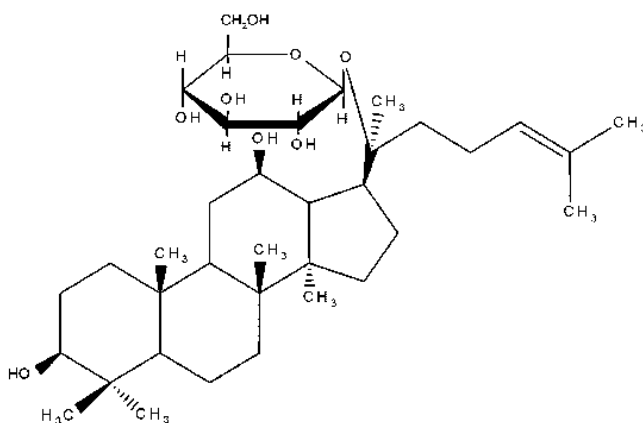
En la presente invención, se descubrió inesperadamente que el ginsenósido M1 es eficaz en la inhibición de la fibrosis renal. En particular, se descubrió que en el modelo UUO en ratones, el daño/inflamación renal se reduce y se inhibe o alivia la progresión de la fibrosis renal.

- 10 El modelo de UUO por intervención quirúrgica en roedores se ha utilizado durante décadas como un modelo experimental de UUO de alto rendimiento. Este modelo no se complica con la hipertensión, proteinuria o hiperlipidemia, y no implica ninguna agresión inmunitaria o toxica renal aparente. Dependiendo de la duración de la obstrucción, la UUO puede imitar distintos estadios de nefropatía obstructiva que da lugar en último término a la fibrosis tubulointersticial. La esperanza de vida del animal no está comprometida, debido a que la función del riñón contralateral se mantiene o incluso aumenta como resultado de una hipertrofia anatómica y funcional compensadora. Otras ventajas de este modelo incluyen el hecho de que la progresión de la fibrosis renal es altamente predecible y reproducible y da lugar a una fibrosis significativa y pérdida de nefronas en un periodo relativamente corto (7-14 días). Véase, por ejemplo, Eddy y col., Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models, *Pediatr Nephrol.* 2012 ago.; 27(8):1233-47; y Grande MT y Lopez-Novoa JM, Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy, *Nat Rev Nephrol.* 2009 jun; 5(6):319-28.

- 25 Los ejemplos y los datos posteriores muestran los efectos inesperados del ginsenósido M1, que incluyen (1) la reducción de apoptosis celulares y daño tubular en los tejidos intersticiales renales, (2) la prevención de fibrosis y depósito de colágeno en los tejidos intersticiales renales, (3) la reducción de la activación de NF- κ B, (4) prevención de la infiltración de macrófagos y linfocitos T en el riñón, y (5) mantenimiento de la función normal de las células madre hematopoyéticas y la inmunidad celular sistémica.

En consecuencia, la presente invención proporciona una nueva estrategia para la inhibición de la fibrosis renal en un sujeto que lo necesite mediante la administración de una cantidad eficaz de ginsenósido M1 al sujeto.

El ginsenósido M1, 20-O- β -D-glucopiranosil-20(S)-protopanaxadiol es uno de los metabolitos saponínicos conocidos en la técnica. La estructura química del ginsenósido M1 es la siguiente:



- 30 Entre estos, el ginsenósido M1 se conoce como un metabolito de los ginsenósidos tipo protopanaxadiol mediante la ruta gipenósido por las bacterias del intestino humano. El ginsenósido M1 se puede encontrar en la sangre o la orina tras la ingesta. El ginsenósido se puede preparar a partir de plantas de ginseng mediante fermentación fúngica por procedimientos conocidos en la técnica, tal como la Solicitud de Patente de Taiwán N.º 094116005 (I280982) y la Patente de EE. UU. N.º 7.932.057. En ciertas realizaciones, las plantas de ginseng para la preparación del ginsenósido M1 incluyen la familia *Araliaceae*, género *Panax*, por ejemplo, *P. ginseng* y *P. pseudo-ginseng* (también llamada Sanqi). En general, el procedimiento de preparación del ginsenósido M1 incluye las etapas de (a) proporcionar polvo de materiales de plantas de ginseng (por ejemplo, hojas o tallos); (b) proporcionar un hongo para la fermentación de los materiales de la planta de ginseng, en la que la temperatura de fermentación varía desde 20-50 °C, la humedad de fermentación varía desde el 70-100 %, el valor del pH varía desde 4,0-6,0, y el periodo de fermentación varía de 5-15 días; (c) extraer y recolectar los productos de fermentación; y (d) aislar el 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 entender como no aislado o purificado absolutamente, sino relativamente aislado o purificado. Por ejemplo, ginsenósido M1

purificado se refiere al que está más purificado que en la forma en que existe en la naturaleza. En una realización, una preparación que comprende ginsenosido M1 purificado puede comprender ginsenosido 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. Se debería entender que cuando se utiliza cierto número en el presente documento para mostrar una relación o dosificación, dicho número incluye generalmente que dentro del intervalo de un 10 % más o menos, o más específicamente, el alcance de un 5 % más y menos que el número.

La presente invención proporcionar el ginsenosido M1 para su uso en el procedimiento de inhibición/tratamiento de la fibrosis renal, en el que el ginsenosido M1 se utiliza en una cantidad eficaz a un sujeto que lo necesite. También se proporciona el ginsenosido M1 para su uso en la fabricación de un medicamento para la inhibición de la fibrosis renal en un sujeto que lo necesite. El ginsenosido M1 de la invención es eficaz para la reducción o alivio de uno o más síntomas o afecciones, incluyendo, pero sin limitarse a, inflamación leucocítica mononuclear, dilatación tubular, atrofia tubular, proliferación de células epiteliales tubulares, proliferación de células epiteliales tubulares, activación de fibroblastos o miofibroblastos y deposición de colágenos (por ejemplo, III o IV), particularmente en el compartimento tubulointersticial del sujeto. Específicamente, el medicamento de la invención es eficaz en la reducción o alivio de la infiltración leucocítica mononuclear o fibrosis en el intersticio renal del sujeto.

El término "individuo" o "sujeto" que se utiliza en el presente documento incluye el ser humano y animales no humanos tales como los 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). En ciertas realizaciones, el sujeto que se va a tratar por el procedimiento de la invención se identifica porque tiene una nefropatía obstructiva.

El término "tratar" o "tratamiento" como se utiliza en el presente documento se refiere a la aplicación o administración de una composición que incluye uno o más principios activos a un sujeto que padece un trastorno, o una progresión del trastorno, con el fin de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, recuperar, mejorar, o afectar el trastorno, los síntomas o afecciones del trastorno, las discapacidades inducidas por el trastorno, o la progresión del trastorno o los síntomas o afecciones del mismo. El término "prevenir" o "prevención" como se utiliza en el presente documento se refiere a la aplicación o administración de una composición que incluye uno o más principios activos a un sujeto que es susceptible o está predispuesto a un trastorno o un síntoma o afección del mismo y se refiere por tanto a la prevención de que ocurra el trastorno o el síntoma o afección del mismo o las causas subyacentes del mismo.

La expresión "cantidad eficaz" que se utiliza en el presente documento se refiere a la cantidad de un principio activo para impartir un efecto terapéutico deseado en un sujeto tratado. Por ejemplo, una cantidad eficaz para el tratamiento o prevención de la fibrosis renal puede ser una cantidad que impida, mejore, alivie, reduzca o prevenga uno o más síntomas o afecciones o la progresión de los mismos tales como la inflamación leucocítica mononuclear, dilatación tubular, atrofia tubular, proliferación de células epiteliales tubulares, activación de fibroblastos o miofibroblastos y depósito de colágenos (III o IV), particularmente en el compartimento tubulointersticial. Los síntomas se pueden determinar y evaluar utilizando procedimientos conocidos en la técnica basándose en distintos índices relacionados con el progreso de la enfermedad, por ejemplo, analizando las secciones renales mediante tinción. La cantidad eficaz puede cambiar dependiendo de distintas razones, tales como la vía y frecuencia de administración, peso corporal y especie del individuo que recibe dicho producto farmacéutico, y el fin de la administración. Los expertos en la técnica pueden determinar la dosificación en cada caso basándose en la divulgación del presente documento, procedimientos establecidos, y su propia experiencia. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la dosificación oral del ginsenosido M1 que se utiliza en la presente invención es de 10 a 1.000 mg/kg al día. En algunos ejemplos, la dosificación oral de ginsenosido M1 que se utiliza en la presente invención de 100 a 300 mg/kg al día, 50 a 150 mg/kg al día, 25 a 100 mg/kg al día, 10 a 50 mg/kg al día, o 5 a 30 mg/kg al día. Además, en algunas realizaciones de la invención, el ginsenosido M1 se administra periódicamente durante un cierto periodo de tiempo, por ejemplo, una administración diaria durante al menos 5 días, 10 días o 15 días, un mes o dos meses o más tiempo.

De acuerdo con la presente invención, el ginsenosido M1 se puede utilizar como principio activo para tratar o prevenir la fibrosis renal. En una realización, una cantidad eficaz de un principio activo se puede formular con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una composición farmacéutica de una forma apropiada con el fin del suministro y la absorción. Dependiendo del procedimiento de administración, la composición farmacéutica de la presente invención comprende preferentemente aproximadamente un 0,1 % por peso a aproximadamente el 100 % por peso del principio activo, en el que el porcentaje por peso se calcula basándose en el peso de la composición completa.

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 ingrediente activo y es seguro para el individuo que recibe el tratamiento. Dicho vehículo puede ser un diluyente, vehículo, excipiente, o matriz para el principio activo. Algunos ejemplos de excipientes apropiados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbosa, manosa, almidón, goma arábiga, fosfato cálcico, 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 magnésico, y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y suspensores; conservantes, tales como metil y propil hidroxibenzoatos; edulcorantes; y agentes saborizantes. La composición de la presente invención puede proporcionar el efecto de liberación rápida, continua, o retardada del principio activo después de la administración al paciente.

De acuerdo con la presente invención, la forma de dicha composición puede ser en comprimidos, píldoras, polvos, pastillas para chupar, paquetes, trociscos, elixires, suspensiones, lociones, soluciones, jarabes, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, inyecciones de fluido esterilizado, y polvo empaquetado.

La composición de la presente invención se puede suministrar mediante cualquier vía fisiológicamente aceptable, tal como oral, parenteral (tal como intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal), transdérmica, supositorio, e intranasal. Con respecto a la administración parenteral, se utiliza preferiblemente en forma de una solución en agua estéril, que puede comprender otras sustancias tales como sales o glucosa suficiente para hacer que la solución sea isotónica con la sangre. La solución acuosa puede estar apropiadamente tamponada (preferentemente con un valor de pH de 3 a 9) según sea necesario. La preparación de una composición parenteral apropiada en condiciones estériles se puede conseguir con técnicas farmacológicas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica, y no se necesita una labor creativa extraordinaria.

De acuerdo con la presente invención, el ginsenósido M1 o las composiciones que comprenden el ginsenósido M1 como principio activo son para su uso en el tratamiento o prevención de la fibrosis renal. Específicamente, el ginsenósido M1 o las composiciones que comprenden el ginsenósido M1 como principio activo se pueden administrar a individuos con fibrosis renal o individuos con riesgo de adquirir una fibrosis renal de manera que se prevenga que se produzca la enfermedad o mejorar los síntomas o retrasar el deterioro de los síntomas. Específicamente, el ginsenósido M1 se puede administrar antes o en el momento de la aparición de la fibrosis renal, o el ginsenósido M1 se puede administrar después de la aparición de la fibrosis renal.

Además, de acuerdo con la presente invención, el ginsenósido M1 o la composición que comprende el ginsenósido M1 como principio activo se puede utilizar en combinación con procedimientos terapéuticos o medicamentos existentes, tales como un tratamiento farmacéutico, que incluye pero no se limita a corticosteroides (tales como prednisolona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos citotóxicos (tales como ciclofosfamida, clorambucilo, y azatioprina), inmunosupresores (tales como ciclosporina y micofenolato de mofetilo), y vasodilatadores (tales como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (inhibidores de la ECA)). En una realización, el medicamento o procedimiento terapéutico utilizado en combinación se puede utilizar simultáneamente (en paralelo) o secuencialmente. Cuando los medicamentos se utilizan en combinación, los medicamentos pueden mezclarse en la misma fórmula o dispuesto en diferentes fórmulas por separado, tal como en cápsulas, píldoras, comprimidos, e inyecciones.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que se proporcionan con el propósito de demostración más que de limitación.

Ejemplo

1. Materiales y procedimientos

1.1 Modelo animal y protocolo de experimentación

Modelo animal de UUO (Obstrucción ureteral unilateral)

Se adquirieron ratones C57BL/6 machos de 8 semanas de edad en el National Laboratory Animal Breeding and Research Center (Taipei, Taiwán) y se mantuvieron en el centro de animales del National Laboratory Animal Breeding and Research Center (Taipei, Taiwán). Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo con la aprobación del Institutional Animal Care and Use Committee of The National Defense Medical Center, Taiwán, y eran consistentes con los National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Los ratones se anestesiaron en primer lugar con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.). Después se hizo una incisión en el flanco izquierdo, se expuso el uréter izquierdo, se ligó con suturas de seda de 6-0 en dos puntos, y se cortó entre las dos ligaduras. Por último, se suturaron la membrana peritoneal y la piel. Se llevó a cabo una falsa cirugía como control siguiendo todas las etapas del procedimiento UUO excepto la ligadura y corte del uréter. (Xiao y col. Adenosine A2A receptor: a target for regulating renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy, PLoS One. 2013 abr 9;8(4): e60173).

En resumen, todos los ratones recibieron analgesia preoperatoria (una inyección subcutánea de 50 mg/kg de buprenorfina (Temgesic, Shering-Plough)) y posteriormente se ligó el uréter derecho con seda de 6.0 a través de una pequeña incisión abdominal bajo anestesia inducida con isoflurano al 2,0 %. El abdomen se cerró en dos capas y se permitió a los ratones que se recuperaran de la cirugía durante 12 horas a 28 °C en una estufa ventilada. Los ratones se sacrificaron 7 o 14 días después de la cirugía (Pulskens, y col. Nlrp3 prevents early renal interstitial edema and vascular permeability in unilateral ureteral obstruction, PLoS One. 2014 abr 15;9(1): e85775).

1.2 Ginsenosido M1 y administración

El ginsenósido M1 20-O-β-D-glucopiranosil-20(S)-protopanaxadiol (llamado LCHK168 posteriormente), se preparó por procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en la Solicitud de Patente de Taiwán N.º 094116005 (I280982) y la patente de EE. UU. N.º 7.932.057. El LCHK168 se disolvió en un 3 % de cremofor (Sigma-Aldrich).

Comenzando desde un día antes de la operación de UUO, se les dio a los ratones una dosis diaria de LCHK168 (30 mg/kg) por inyección intraperitoneal hasta el sacrificio.

1.3 Histopatología renal

5 Los tejidos renales embebidos en parafina se seccionaron y tiñeron con tricrómica de Masson y hematoxilina y eosina (H/E) utilizando protocolos convencionales. Para la histopatología, los tejidos se fijaron en formalina tamponada al 10 % y se embebieron en parafina, y luego se prepararon secciones (3 mm) y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H/E).

10 Se examinaron todas las secciones después de montarlas. Los procedimientos de análisis semicuantitativo son de acuerdo con el grado de inflamación y fibrosis en el túbulo-intersticio renal mientras se seleccionan aleatoriamente 20 campos para la puntuación. "0" indica una morfología normal, "1" indica que el área de influencia es menor del 10 %, "2" indica que el área de influencia es alrededor de un 10 a un 30 %, "3" indica que el área de influencia es alrededor del 30 al 50 % y "4" indica que el área de influencia es más del 50 %.

1.4 Inmunohistoquímica (IHC) y detección de la apoptosis

15 Para la IHC, se incubaron las secciones de tejido fijadas en formalina y embebidas en parafina durante una noche a 4 °C con anticuerpos contra PCNA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), CD3 (DAKO, Glostrup, Dinamarca), α -SMA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), Colágeno III, Colágeno IV (ambos de Southern Biotech, Birmingham, AL, USA), F4/80 (monocitos/macrófagos; Serotec, Raleigh, NC, USA), fosfo-NF- κ B p65 (pNF- κ B p65; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), diluido en tampón de dilución de anticuerpos DAKO (DAKO, Glostrup, Dinamarca), y luego durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios (DAKO) conjugados con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) o un polímero HRP anti-conejo (BioGenex, Fremont, CA, USA) en el mismo tampón, y luego se añadió DAb (BioGenex). Se utilizó la hematoxilina para contra teñir el núcleo. Para la detección de apoptosis, se utilizó un ensayo de marcado del extremo libre por dUTP mediado por transferasa terminal (TUNEL). Las secciones fijadas en formalina se tiñeron utilizando el kit ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis detection (Chemicon, Temecula, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se hizo un recuento de la abundancia de α -SMA, colágeno III, colágeno IV o el número de células NF- κ B p65⁺, PCNA⁺, F4/80⁺, CD3⁺ fosforiladas y apoptóticas con una magnificación de campos seleccionados aleatoriamente de x400 del compartimento tubulointersticial en el área cortical mediante un software de análisis cuantitativo de imágenes Pax-It (Paxcam).

1.5 Citometría de flujo

30 Se trataron los esplenocitos de los ratones con cloruro amónico tamponado Tris para eliminar los eritrocitos, se lavaron y se resuspendieron en medio RPMI1640 suplementado con un 10 % de suero bovino fetal, tampón Hepes, L-glutamina, y penicilina/estreptomicina (todos de Invitrogen/Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Las células se tiñeron según los marcadores de superficie de linfocitos T o B utilizando anticuerpos anti-CD3 de ratón conjugados con FITC (17A2) para linfocitos T, anticuerpos anti-CD19 de ratón (1D3) para linfocitos B, y anticuerpos anti-CD69 de ratón conjugados con ficoeritrina (H1.2F3; todos los anticuerpos de BD Biosciences). Para los análisis de médula ósea de los ratones se aislaron como se habían descritos (Takeshita S y col., 2014), y se tiñeron con anticuerpos contra Sca-1 (BD Biosciences) o CD34 (eBioscience, San Diego, CA, USA) de ratón. Se llevó a cabo el análisis de citometría de flujo utilizando un FACSCalibur (BD Biosciences).

1.6 Tinción tricrómica de Masson

40 Se incubaron secciones renales de tres μ m en 75 °C durante 15 minutos. Se transfirieron los portaobjetos en xylene y un gradiente alcohólico. Se montó el mordiente en los portaobjetos, seguido por tinción con hematoxilina durante 1 minuto. Tras la tinción con solución naranja G al 0,75 %, solución B de tinción de Masson, una solución de ácido fosfotúngstico al 2,5 %, y solución de tinción de anilina azul, los portaobjetos se lavaron con ácido acético al 1 % dos veces y se montaron con goma arábica. Se secó al aire unos minutos y las secciones teñidas se examinaron en el microscópico óptico.

45 1.7 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

Se recolectaron muestras de orina del cáliz y la pelvis con una jeringa de insulina de calibre 29G. Como controles normales, se recolectó la orina mediante jaulas metabólicas. Se detectaron entonces MCP-1, TNF- α e IL-1 β por ELISA siguiendo el manual de instrucciones (eBioscience y R&D). En resumen, el anticuerpo de captura se revistió en placas de 96 pocillos durante una noche. Después del lavado con el tampón de bloqueo PBST, se cargaron en orden las muestras, anticuerpo de detección, avidina-HRP. Se desarrollaron los colores después de la etapa de sustrato TMB, y luego se añadió H₂SO₄ 2 N para parar la reacción. Finalmente, se midió la DO 450 nm.

1.8 Análisis estadístico

Los valores son la media $\pm$ SD. Se llevó a cabo la comparación entre dos grupos utilizando el ensayo T de Student. Se consideró un valor de P < 0,05 estadísticamente significativo.

2. Resultados

2.1 Establecimiento del modelo UUO experimental

Se llevaron a cabo los experimentos en ratones C57BL/6 de 8-10 semanas de edad. Los ratones se dividieron aleatoriamente en el control falso, control enfermo y grupo de terapia con LCHK168 y se sacrificaron después de la UUO durante 7 o 14 días. Se observó retención de orina en la pelvis del riñón de la UUO, indicando que el modelo de UUO se estableció satisfactoriamente. Véase la Fig. 1A y Fig. 1B.

2.2 Evaluación histopatológica renal

Se recolectaron los tejidos renales, se fijaron y se sometieron a tinción con H/E. Como se muestra en la Fig. 2, a los 7 días los ratones de control enfermo presentaban una infiltración leucocítica mononuclear y dilatación tubular en el área intersticial, y esta histopatología era inhibida por la administración de LCHK168. El día 14 de UUO se observaban fibrosis y atrofia tubular, que se inhibían significativamente después de la administración de LCHK168.

2.3 Evaluación de apoptosis y proliferación celular renal

En el riñón con UUO, el estrés mecánico causado por la retención de orina, y la liberación de citocinas y ROS por las células renales como respuesta al estrés producirá daño celular, que daría lugar a la autorrenovación celular o una reacción de apoptosis. La tinción de TUNEL de la sección renal para las células apoptóticas se presentaba en el área intersticial renal con UUO, y disminuía después de la administración con LCHK168. Véase la Fig. 3A.

La tinción inmunohistoquímica de la sección renal con el antígeno nuclear celular de proliferación (PCNA), un marcador no solo para el estado proliferativo de las células epiteliales tubulares sino también los miofibroblastos y células inflamatorias, presentaban un aumento significativo después de la UUO particularmente en el túbulo dilatado. Sin embargo, la expresión de PCNA disminuía después de la administración de LCHK168. Estos resultados indicaban que el LCHK168 podía atenuar la apoptosis y daño celular. Véase la Fig. 3B.

2.4 Evaluación de la expresión de fibrosis

En el riñón UUO, la fibrosis es una respuesta de mala adaptación al daño tisular renal y se desarrollará a disfunción renal irreversible si persiste la obstrucción. La tinción histoquímica de la sección renal con tinción tricrómica de Masson presentaba un aumento significativo de fibrosis tisular en el área intersticial de UUO en comparación con el control falso, y disminuía después de la administración de LCHK168. Véase la Fig. 4A. Se llevó a cabo un examen adicional mediante tinción inmunohistoquímica de la sección renal para α -SMA, colágeno III y IV, que se expresan fuertemente en el área intersticial de UUO y disminuía después de la administración de LCHK168. Véase la Fig. 4B-E. Estos datos obtenidos demostraban que el LCHK168 puede mejorar la activación de miofibroblastos y fibrosis renal en el intersticio renal.

2.5 Respuesta inflamatoria modulada por NF- κ B

2.5.1 Expresión de NF- κ B en el tejido renal

El NF- κ B es un factor nuclear esencial de la transcripción para la modulación de factores inflamatorios relacionados por su estimulación de moléculas de citocina y de adhesión celular. Los estudios previos indicaban que el nivel de expresión de NF- κ B estaba elevado en distintos trastornos, incluyendo las enfermedades renales. La tinción inmunohistoquímica de la sección renal para NF- κ B mostraba un aumento de la expresión de NF- κ B, y se inhibía después de la administración de LCHK168. Véase la Fig. 5. Estos datos demostraban que el LCHK168 puede inhibir el NF- κ B en el riñón con UUO.

2.5.2 Infiltración leucocítica mononuclear

Los estudios previos indicaban que las células inflamatorias tienen un importante papel en la patogénesis de la UUO. La infiltración leucocítica mononuclear, especialmente de macrófagos y linfocitos T, se puede observar en el estadio temprano de UUO. Con la persistencia de la obstrucción, las células inflamatorias activadas estimulan las células epiteliales tubulares u otras células inflamatorias para que liberen distintas citocinas y quimiocinas, produciendo el reclutamiento de más células inflamatorias al área intersticial renal induciendo la inflamación y fibrosis renal. La evaluación de la infiltración leucocítica mononuclear se llevó a cabo mediante tinción inmunohistoquímica de una sección renal para F4/80 y CD3+, que son los marcadores de macrófagos y linfocitos T. La expresión de F4/80 y CD3+ aumentaba después de la UUO y disminuía tras la administración de LCHK168. Véase las Fig. 6A, 6B. Los datos obtenidos demostraban que LCHK168 puede prevenir la infiltración de macrófagos y linfocitos T en el intersticio renal.

2.5.3 Evaluación de la expresión de MCP-1, TNF- α e IL- β en la orina

En el estadio inicial, se liberan citocinas y quimiocinas focalmente en el riñón y podrían reclutar células inmunitarias. Y las células inmunitarias liberan entonces más y más factores inflamatorios. Se detectaban MCP-1, TNF- α , e IL-1 β en la pelvis renal. Tanto el grupo UUO y UUO+LCHK expresaban MCP-1, TNF- α e IL- β en comparación con el grupo de control el día 7. Aunque el nivel de estas citocinas y quimiocinas están disminuidas significativamente el día 14 en

el grupo UUO+LCHK en comparación con el grupo UUO. La figura muestra: El LCHK168 podría reducir significativamente el nivel de MCP-1, TNF- α e IL- β urinarias.

2.6 Activación de la inmunidad celular y activación de células madre hematopoyéticas

2.6.1 Activación de linfocitos B y T

- 5 Para examinar si el LCHK168 previene la inflamación local y la fibrosis mediante la inhibición de la inmunidad celular sistémica, los inventores examinaron la activación de linfocitos B y linfocitos T en los esplenocitos por citometría de flujo. Como se muestra en la Fig. 8A y 8B, no hay un cambio significativo en el porcentaje de CD3⁺CD69⁺ (pan B activados) dentro de los tres grupos, ni en CD19⁺CD69⁺ (pan T activados). Los datos obtenidos indican que la nefropatía causada por la UUO puede tener poco efecto sobre la inmunidad celular sistémica, y el LCHK168 puede no evitar la inflamación local y la fibrosis mediante la inhibición de la inmunidad celular sistémica.

2.6.2 Activación de las células madre hematopoyéticas

- 15 Para examinar si el LCHK168 previene la inflamación local y la fibrosis mediante la inhibición de la activación de células madre hematopoyéticas, los inventores examinaron la activación de las células madre y las células madre hematopoyéticas en las células de la médula ósea por citometría de flujo. Como se muestra en la Fig. 9A y 9B no había ningún cambio significativo en el porcentaje de células positivas al antígeno-1 de células madre (células madre hematopoyéticas) y células CD3⁺ (células madre) dentro de los tres grupos. Los datos obtenidos indican que la nefropatía causada por la UUO puede tener poco efecto sobre la actividad de células madre hematopoyéticas, y el LCHK168 puede no evitar la inflamación local y la fibrosis mediante la inhibición de la actividad de células madre hematopoyéticas.

- 20 En resumen, los estudios de los inventores demuestran que el ginsenosido M1 es eficaz en la prevención del desarrollo de la fibrosis renal en el modelo de UUO. En particular, los resultados demuestran (1) una reducción de apoptosis celulares y daño tubular en los tejidos intersticiales renales, (2) una prevención de fibrosis y depósito de colágeno en los tejidos intersticiales renales, (3) una reducción de la activación de NF- κ B, (4) prevención de la infiltración de macrófagos y linfocitos T en el riñón, y (5) una función normal de las células madre hematopoyéticas y la inmunidad celular sistémica. Todos estos hallazgos sugieren que el ginsenosido M1 puede desarrollarse adicionalmente como candidato como un nuevo fármaco para el tratamiento o prevención de fibrosis renal.

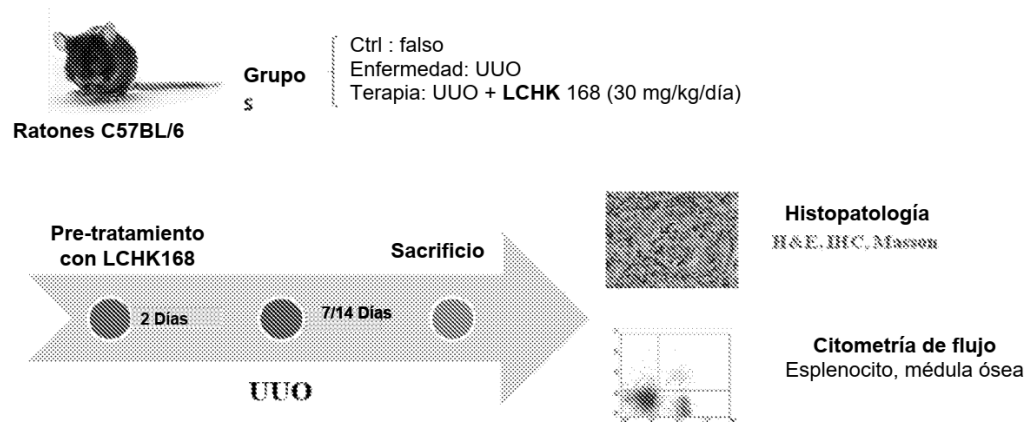
- 25 Se cree que un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención puede utilizar la presente invención en su ámbito más amplio basándose en las descripciones del presente documento sin necesidad de una ilustración adicional. Por lo tanto, las descripciones y reivindicaciones se deberían entender con un fin demostrativo en vez de limitativo de alguna manera del ámbito de la presente invención.
- 30

REIVINDICACIONES

1. El ginsenósido M1 para su uso en el procedimiento de inhibición/tratamiento de la fibrosis renal, en el que el ginsenósido M1 se utiliza en una cantidad eficaz para un sujeto.
- 5 2. El ginsenósido M1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sujeto es un paciente con una nefropatía obstructiva.
3. El ginsenósido M1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ginsenósido M1 se administra en una cantidad eficaz para la reducción o alivio de uno o más síntomas o afecciones, seleccionadas de entre el grupo que consiste en inflamación leucocítica mononuclear, dilatación tubular, atrofia tubular, proliferación de células epiteliales tubulares, activación de fibroblastos o miofibroblastos y depósito de colágenos, en el sujeto.
- 10 4. El ginsenósido M1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ginsenósido M1 se administra en una cantidad eficaz para la reducción o alivio de la infiltración leucocítica mononuclear o fibrosis en el intersticio renal del sujeto.
5. El ginsenósido M1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el diagnóstico o identificación del sujeto con una nefropatía obstructiva antes de la administración del ginsenósido M1.
- 15 6. El ginsenósido M1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 en el que el ginsenósido M1 se administra por vía oral con una dosificación de 10 a 1.000 mg/kg al día, preferentemente con una dosificación de 100 a 300 mg/kg al día, más preferentemente de 25 a 100 mg/kg al día.
7. El ginsenósido M1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en el que el ginsenósido M1 se utiliza en combinación con procedimientos terapéuticos o medicamentos existentes; en el que el procedimiento terapéutico existente es un tratamiento farmacéutico, y en el que los medicamentos existentes son corticosteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos citotóxicos, inmunosupresores, o vasodilatadores.
- 20 8. El ginsenósido M1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ginsenósido M1 se puede administrar antes o en el momento de la aparición de la fibrosis renal, o el ginsenósido M1 se puede administrar después de la aparición de la fibrosis renal.

25

A



B

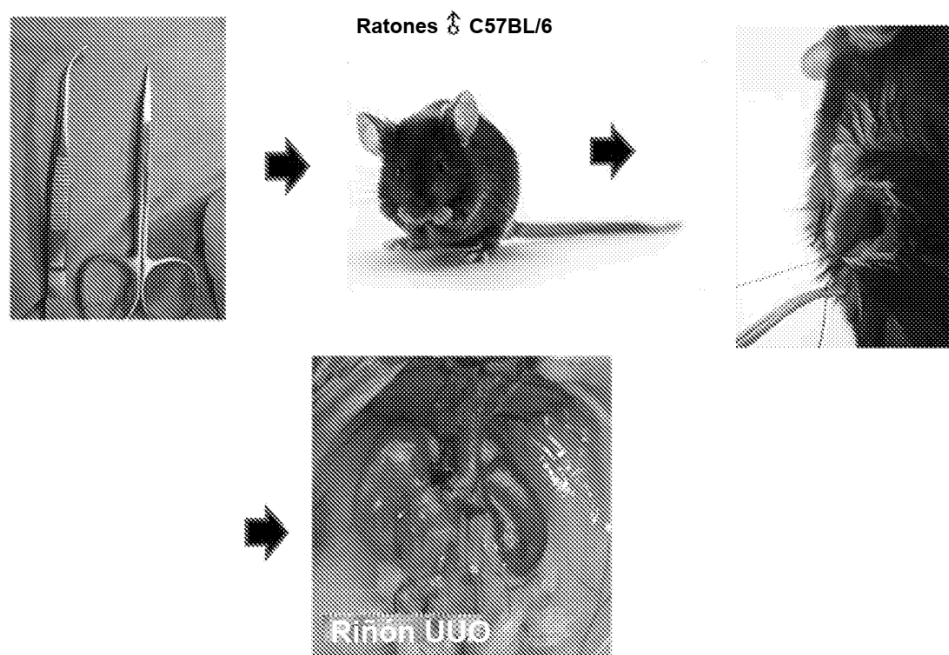
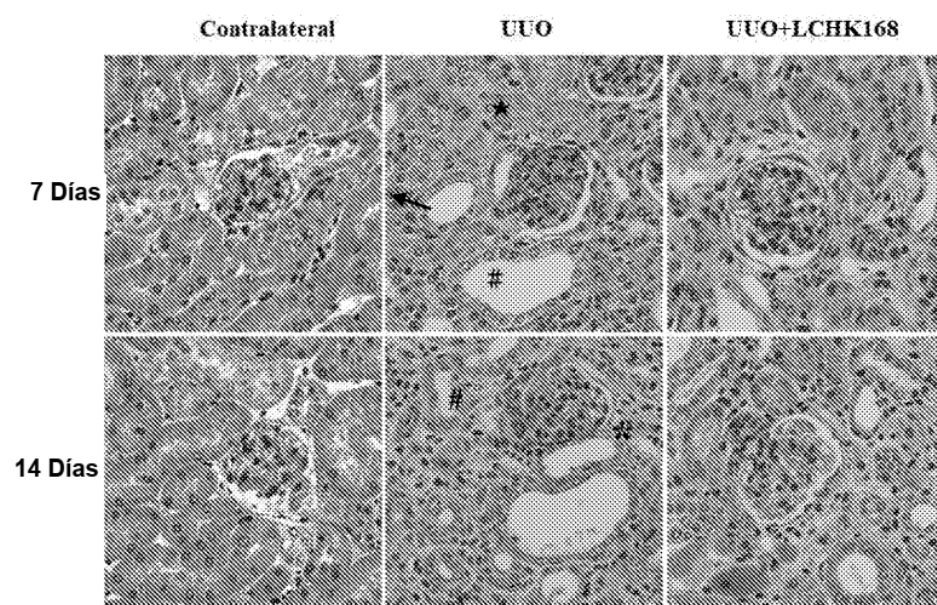


Fig. 1

A



B

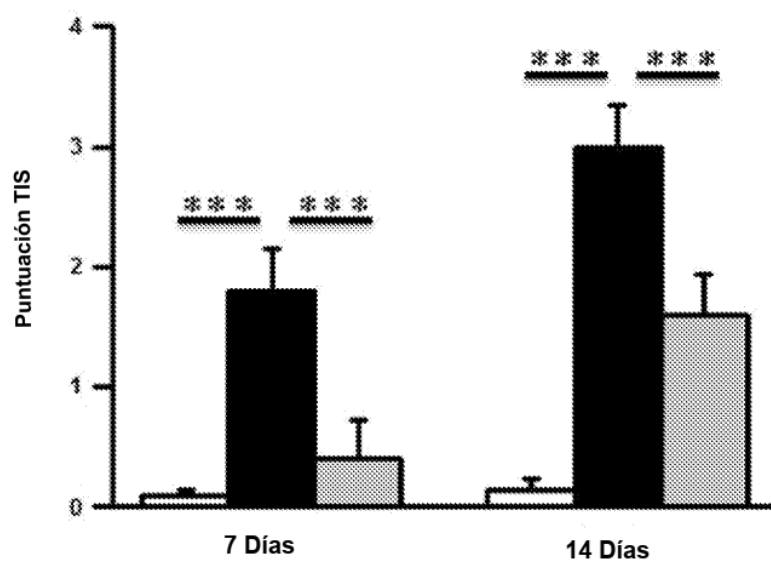
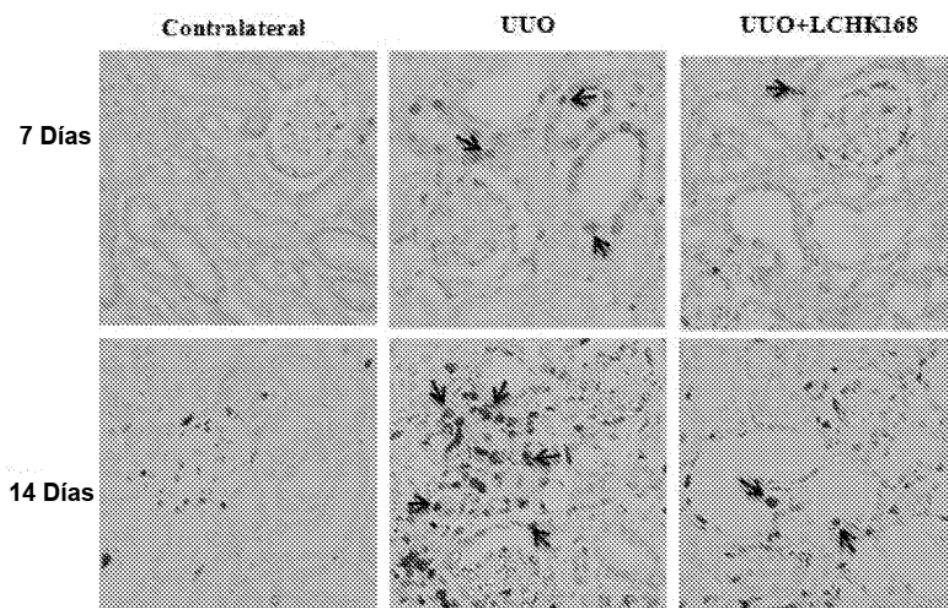


Fig. 2

A



B

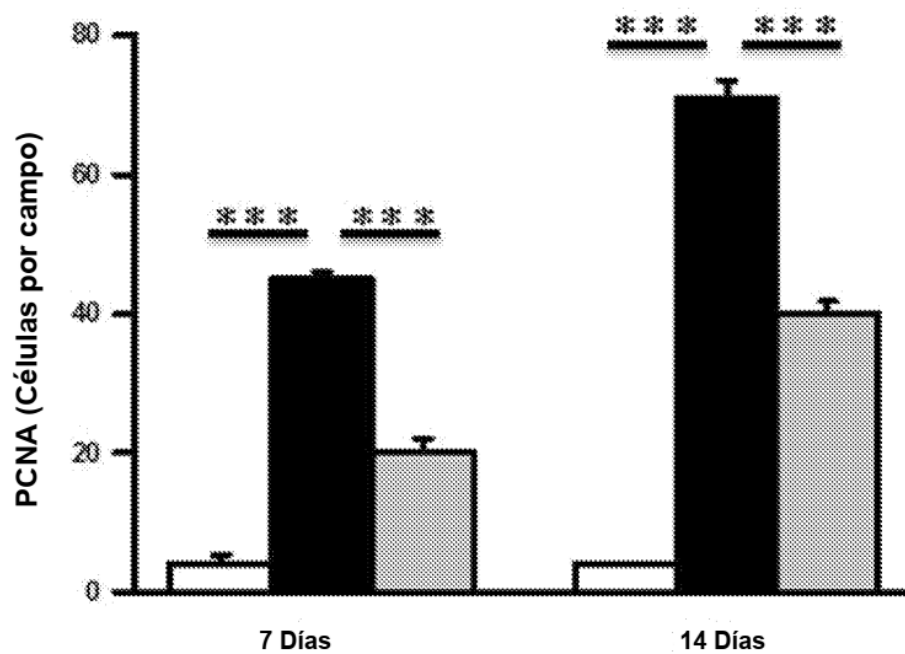
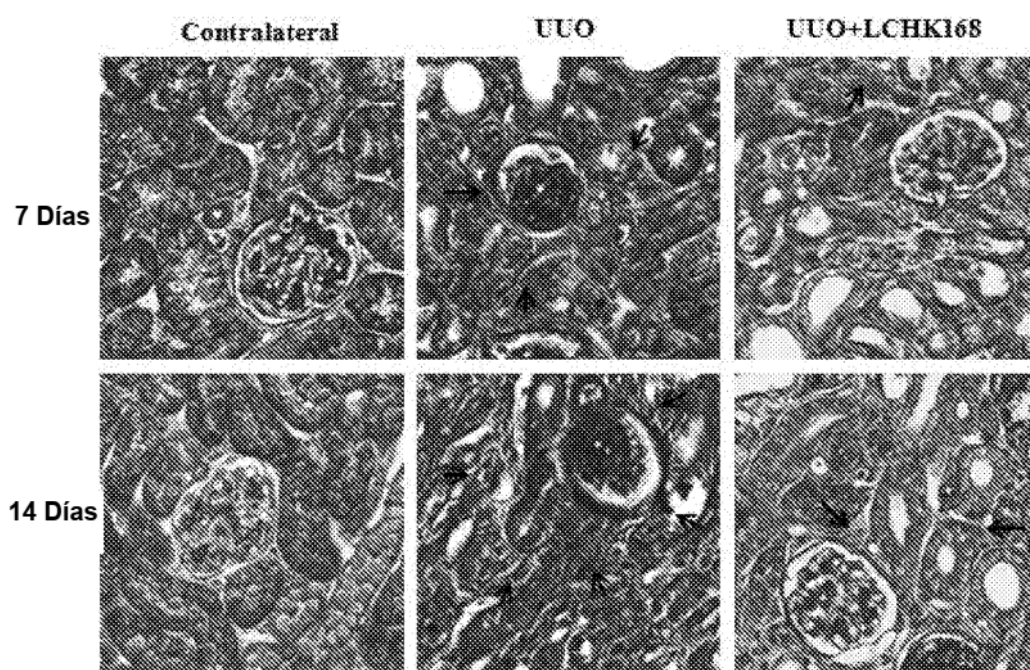


Fig. 3

A



B

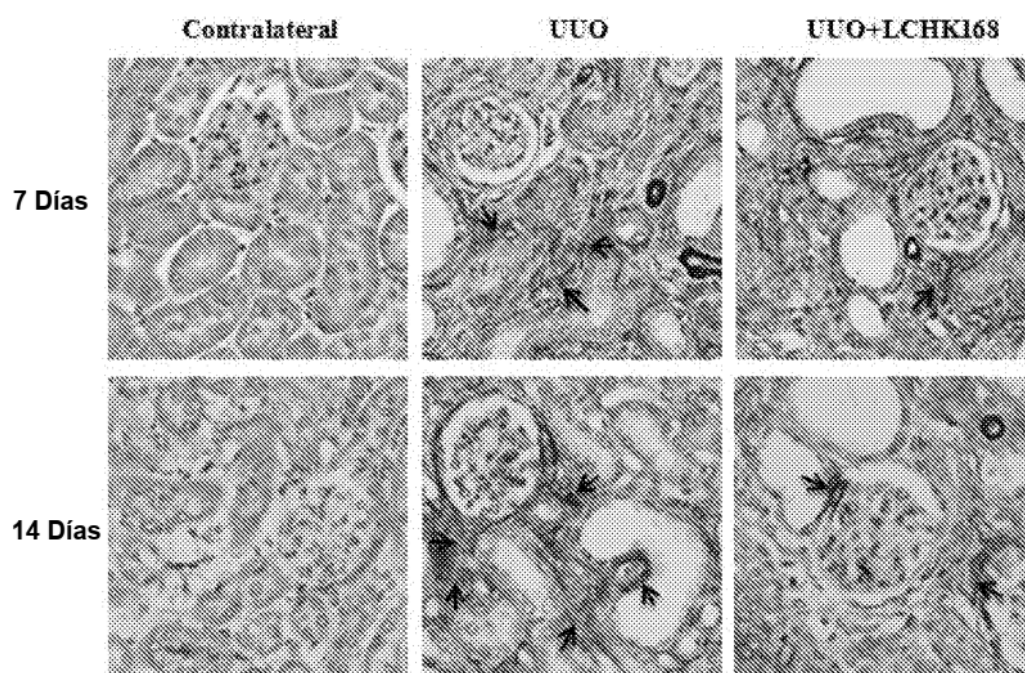
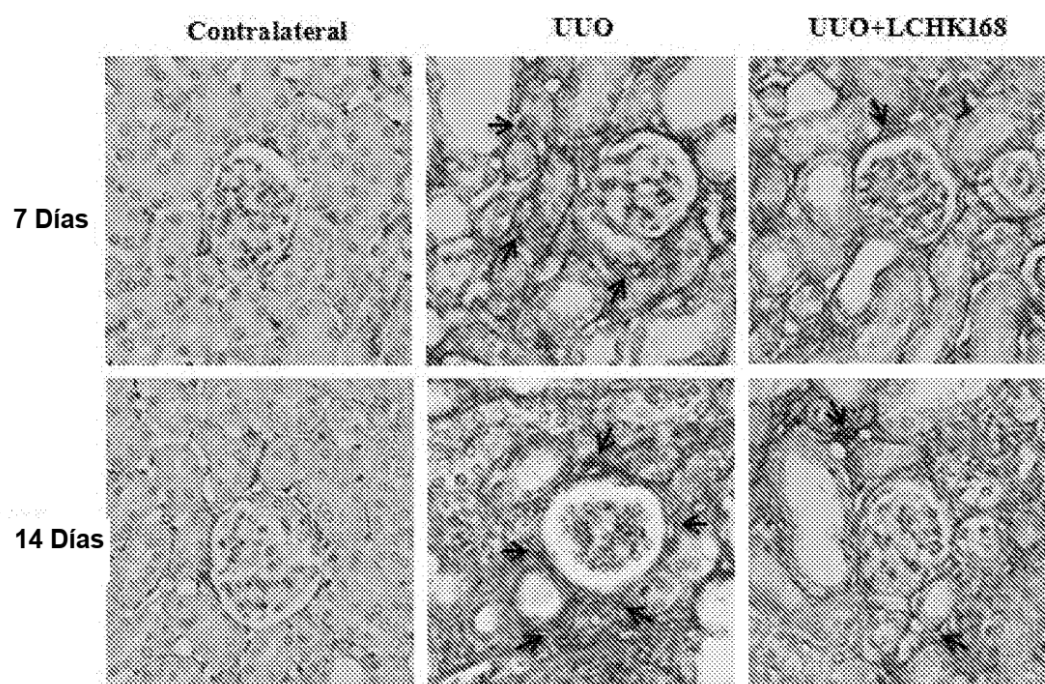


Fig. 4

C



D

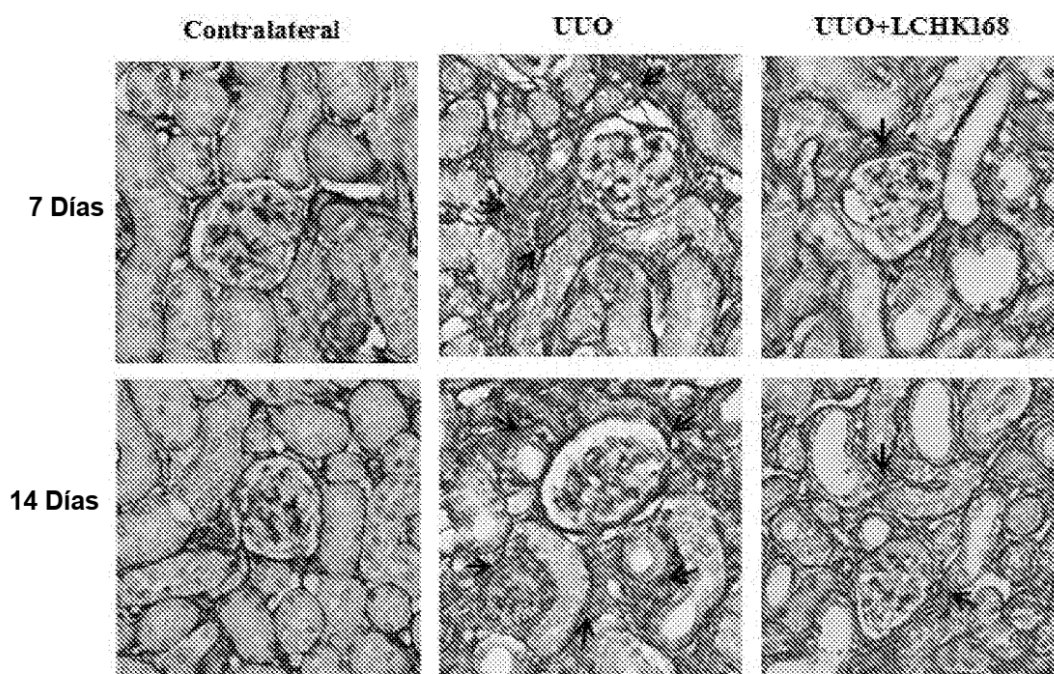


Fig. 4 (Cont.)

E

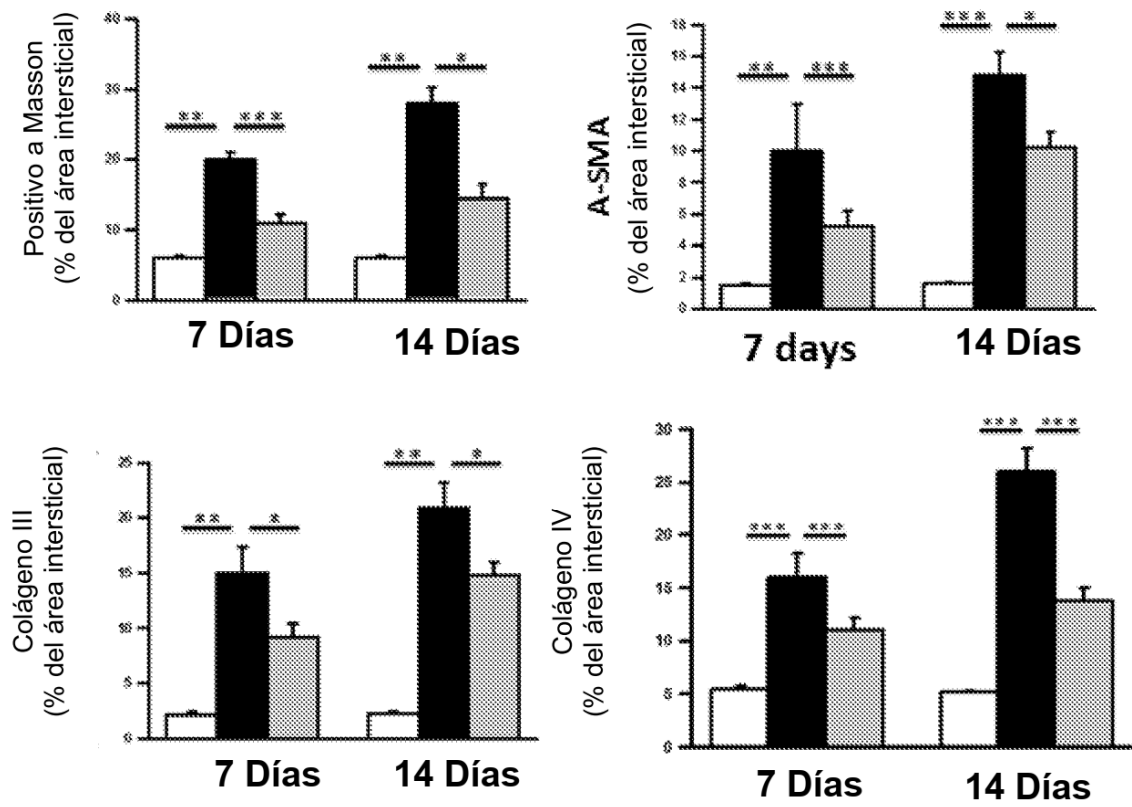
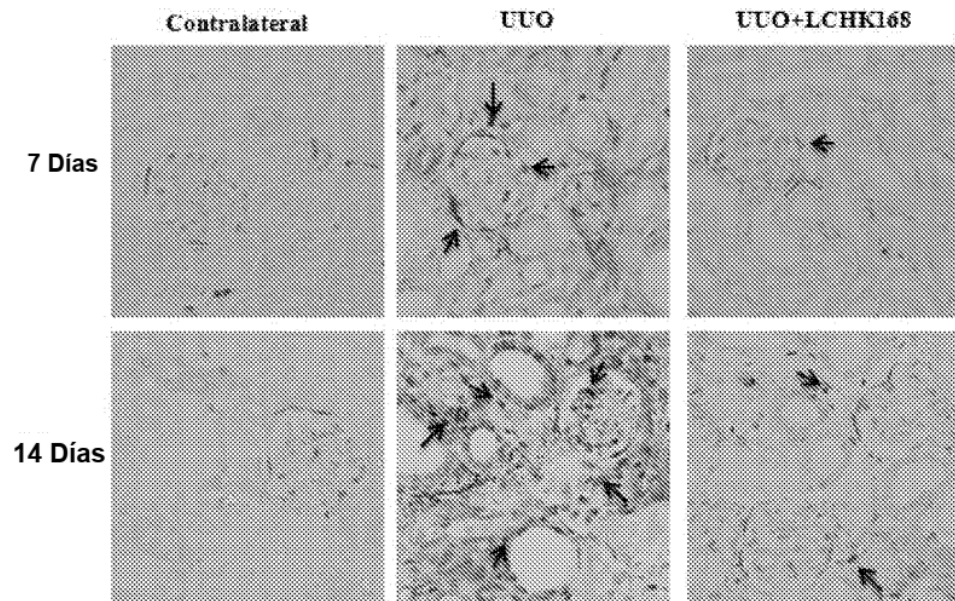


Fig. 4 (Cont.)

A



B

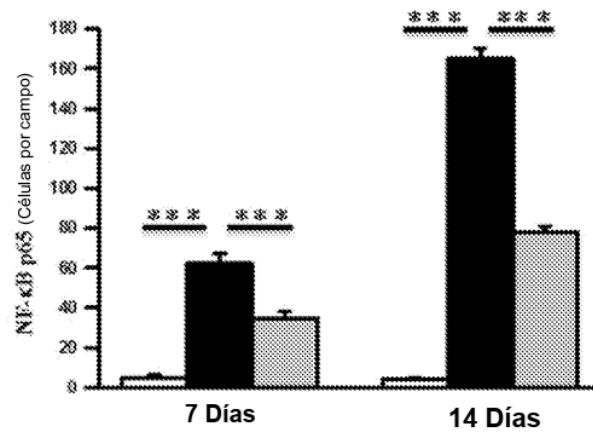
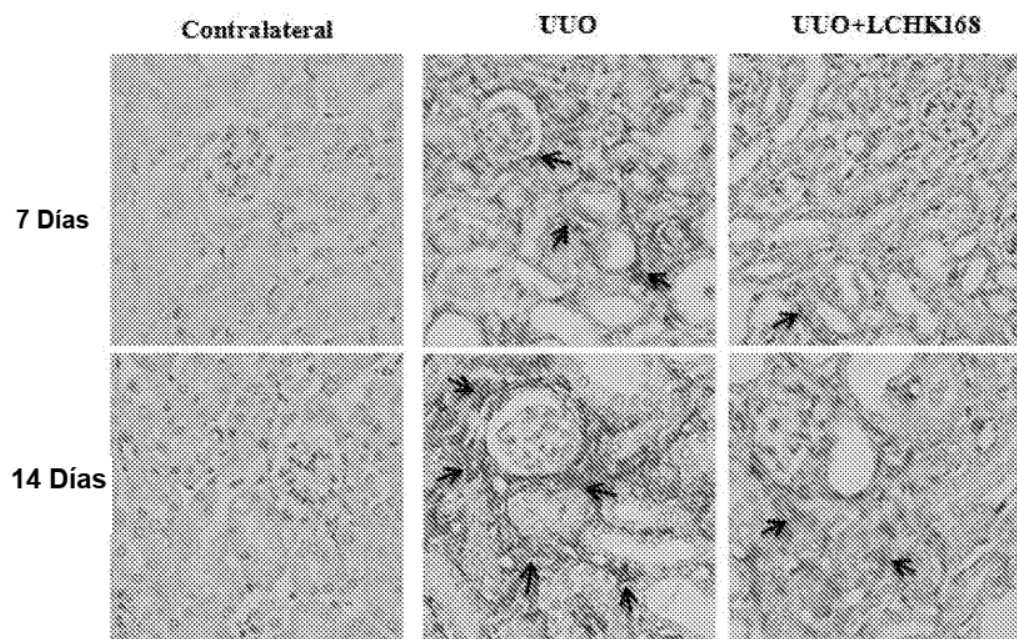


Fig. 5

A



B

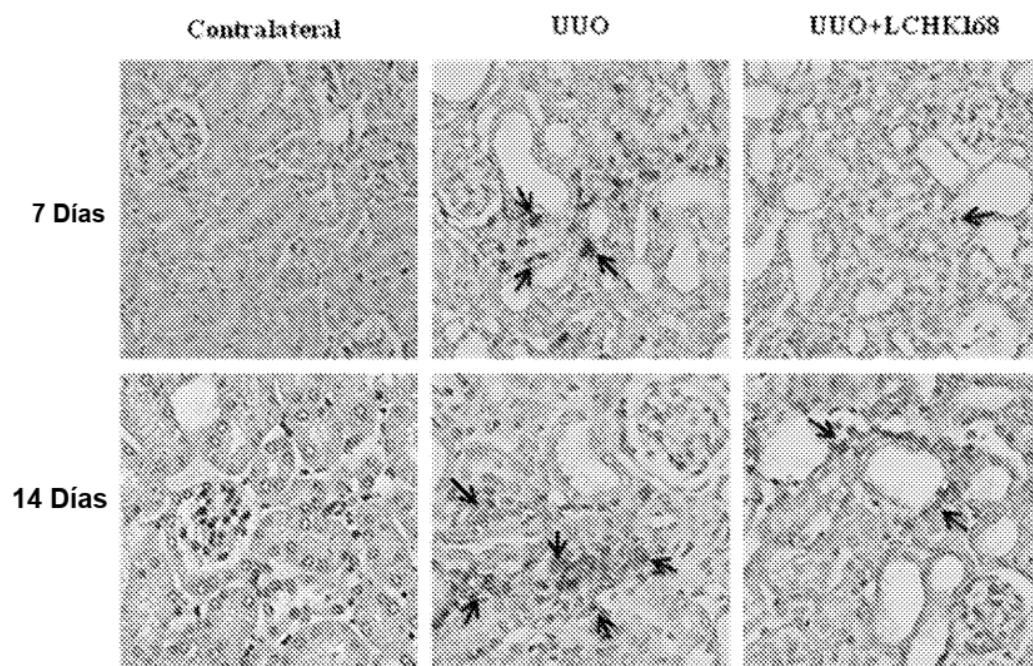


Fig. 6

C

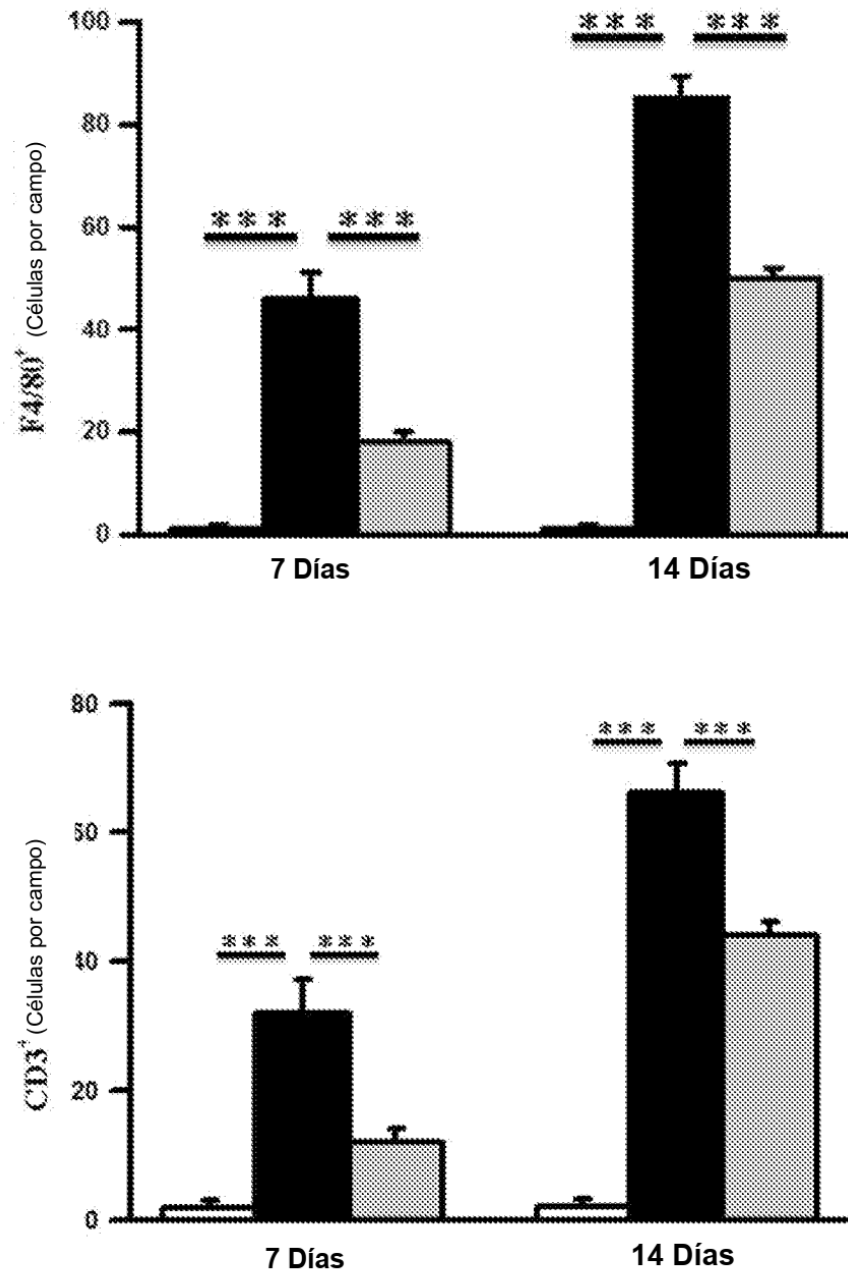
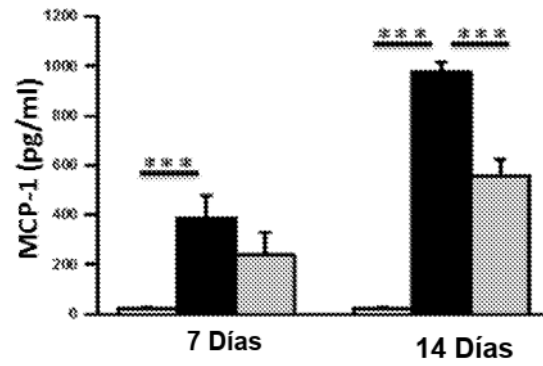
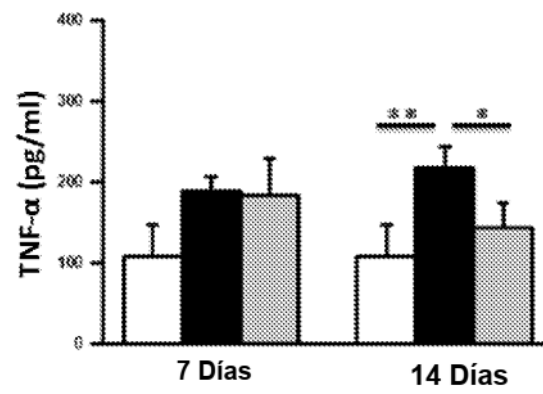


Fig. 6 (Cont.)

A



B



C

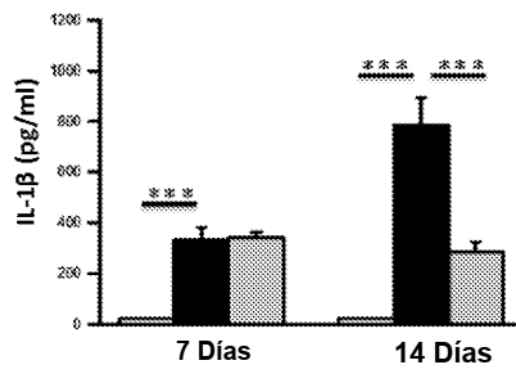
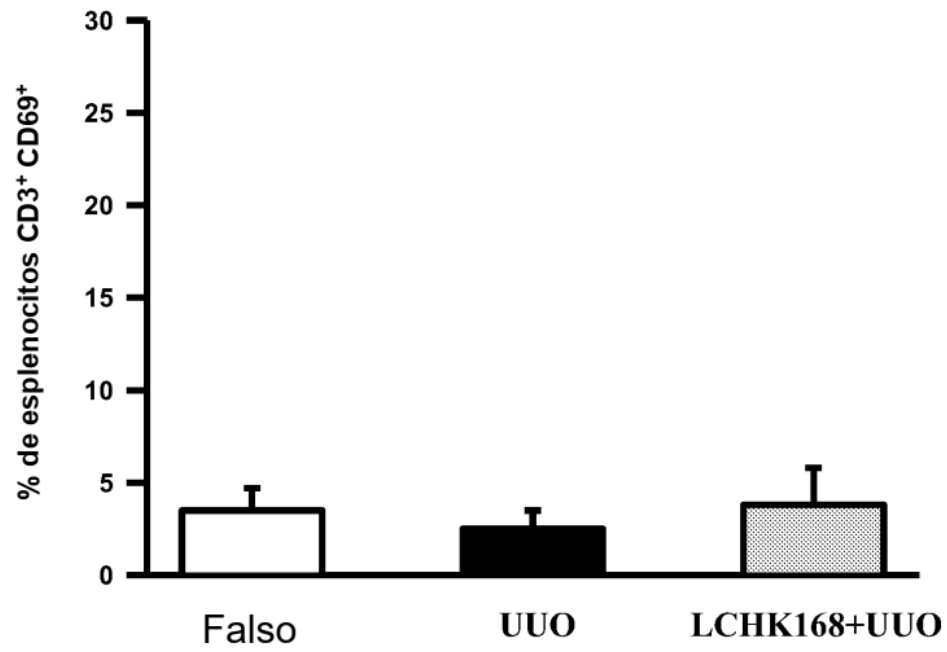


Fig. 7

A



B

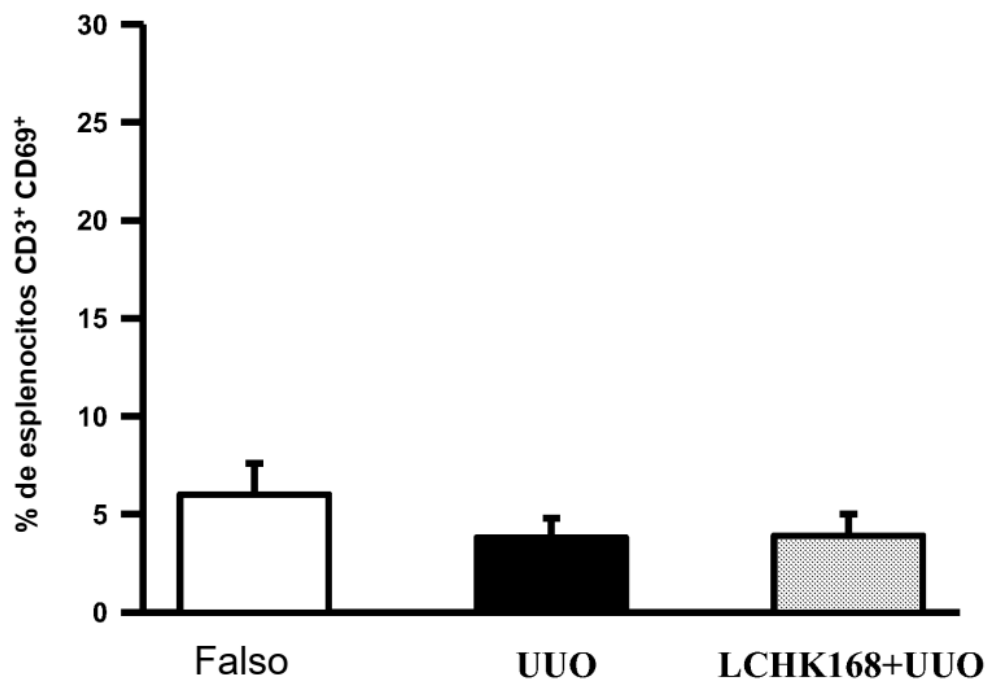
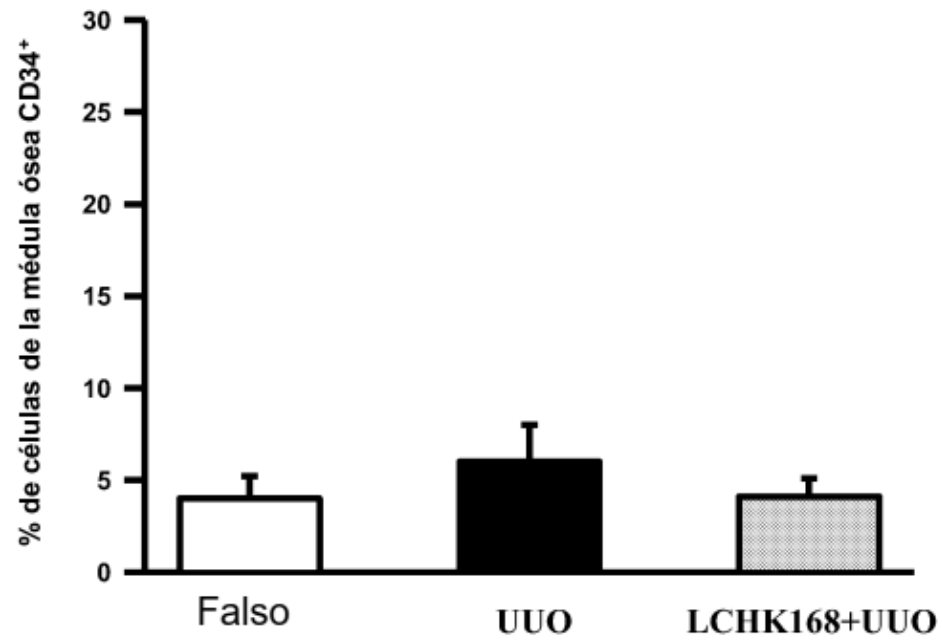


Fig. 8

A



B

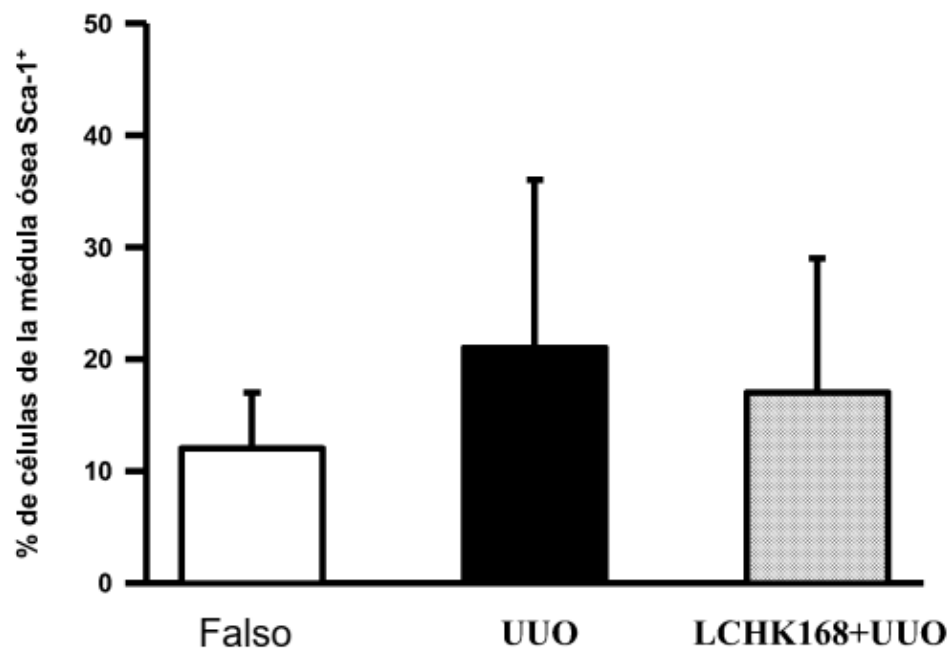


Fig. 9