

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 089**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/48** (2006.01)

**A61K 31/00** (2006.01)

**A61K 31/14** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2022 PCT/EP2022/059468**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2022 WO22214671**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2022 E 22722163 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024 EP 4319784**

54 Título: **Composición farmacéutica para uso en el tratamiento de enfermedad inducida por virus**

30 Prioridad:

**08.04.2021 DK PA202100349**

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

**25.11.2024**

73 Titular/es:

**QUR MEDICAL APS (100.0%)  
Ørsted Bygade 5  
4622 Havdrup, DK**

72 Inventor/es:

**OLSEN, JENS STEEN;  
TORNBY, DITTE SANDFELD y  
ANDERSEN, THOMAS EMIL**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 989 089 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

Composición farmacéutica para uso en el tratamiento de enfermedad inducida por virus

## 5 Campo técnico

La divulgación se refiere a una composición farmacéutica adecuada para el tratamiento o la prevención de una enfermedad causada por un virus, en particular el SARS COVID-19 en cualquiera de sus variantes. La prevención de la enfermedad incluye la administración de la composición farmacéutica al paciente antes o después del contacto con una persona infectada.

## Antecedentes

15 La mayoría de los coronavirus causan resfriados comunes o infecciones leves de las vías respiratorias. Sin embargo, en el 2003 surgió un subgrupo del coronavirus como la variante SARS-CoV, que dio lugar a la epidemia de SARS en 2003. La epidemia supuso un brote de unos 8000 infectados, 800 de los cuales murieron en el periodo comprendido entre 2002 y 2003. Desde el 2004 no se han notificado nuevos casos de infección por el virus del SARS-CoV.

20 En el 2012 se detectó un nuevo tipo de coronavirus al que se denominó MERS-CoV. El MERS-CoV pertenece al mismo subgrupo de coronavirus que el SARS-CoV, pero se distingue genéticamente. Se han notificado más de 2.500 casos hasta enero de 2021, incluidos 45 casos en el año 2020. Alrededor del 35 % de las personas a las que se diagnostica la enfermedad mueren a causa de ella.

25 La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) se identificó por primera vez en Wuhan, China, en diciembre de 2019. El coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) es una cepa de coronavirus causante de la COVID-19 (enfermedad por coronavirus 2019), la enfermedad respiratoria responsable de la actual pandemia de COVID-19. El SARS-CoV-2 es un virus de la especie coronavirus relacionado con el síndrome respiratorio agudo severo (SARSr-CoV), relacionado con el virus SARS-CoV-1 que causó el brote de SARS de 2002-2004. Es de origen zoonótico y presenta una estrecha similitud genética con los coronavirus de murciélago, lo que sugiere que surgió de un virus transmitido por murciélagos. El SARS-CoV-2 pertenece a la amplia familia de virus conocidos como coronavirus. Es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo (+ARNss), con un único segmento lineal de ARN y una envoltura de membrana lipídica.

35 Los coronavirus infectan a los seres humanos, a otros mamíferos, incluidos el ganado y los animales de compañía, y a las especies aviares.

40 Los coronavirus humanos son capaces de causar enfermedades que van desde el resfriado común hasta enfermedades más graves como el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS, tasa de letalidad ~34 %). El SARS-CoV-2 es el séptimo coronavirus conocido que infecta a las personas, después del 229E, NL63, OC43, HKU1, MERS-CoV y el SARS-CoV original.

Una envoltura vírica es la capa más externa de muchos tipos de virus. Protege el material genético en su ciclo vital cuando viaja entre células hospederas.

45 Habitualmente, las envolturas víricas suelen derivar de porciones de las membranas de las células hospederas (fosfolípidos y proteínas), pero incluyen algunas glicoproteínas víricas. Las envolturas pueden ayudar a los virus a evitar el sistema inmunitario del hospedero. Las glicoproteínas de la superficie de la envoltura sirven para identificar y unirse a los sitios receptores de la membrana del hospedero. A continuación, la envoltura vírica se fusiona con la membrana del hospedero permitiendo que la cápside y el genoma vírico entren e infecten al hospedero. Todos los virus con envoltura tienen también una cápside, otra capa de proteínas, entre la envoltura y el genoma.

Los virus con envoltura poseen una gran adaptabilidad y pueden cambiar en poco tiempo para eludir el sistema inmunitario. Los virus con envoltura pueden causar infecciones persistentes.

55 Muchos otros virus con envoltura, tal como VHB, VHC, VIH y los virus de la influenza, son patógenos para el ser humano y tienen importancia clínica. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos de tratamiento adecuados contra las enfermedades inducidas por virus con envoltura.

60 Los virus de la gripe A y B son miembros del género *Influenzavirus* clasificado dentro de la familia de virus con envoltura *Orthomyxoviridae*. Las cepas del virus de la influenza A infectan a una gran variedad de especies animales, incluidos los seres humanos, los caballos, los cerdos, los mamíferos marinos y las aves, mientras que las cepas del virus de la influenza B sólo parecen infectar a las personas.

65 En los seres humanos, las infecciones por los virus de la influenza A y B pueden causar enfermedades respiratorias agudas y a veces graves en personas inmunocompetentes e inmunodeprimidas. La infección vírica por influenza A y B se produce en epidemias anuales, a menudo con un rápido desarrollo de la enfermedad y propagación de la

infección. Estas epidemias pueden producirse en pequeños brotes localizados o como epidemias mundiales, dependiendo del tipo de cepa prevalente. Periódicamente, como resultado de la continua evolución de los virus de la influenza A, se producen epidemias de la enfermedad que pueden tener un impacto significativo en la salud mundial.

5 La transmisión de la infección por el virus de la influenza se produce por inhalación de gotitas que contienen virus procedentes de portadores sintomáticos o de secreciones respiratorias de portadores asintomáticos. Las condiciones del entorno, como la multitud, favorecen la transmisión de la infección. La replicación del virus tiene lugar en las células epiteliales cilíndricas portadoras de cilios de las vías respiratorias superiores e inferiores y provoca la necrosis y el rechazo de las células.

10 La mayor liberación de virus tiene lugar entre 1 día antes y 3-4 días después del inicio de la enfermedad.

15 En el transcurso de una epidemia de influenza, la cepa vírica prevalente puede estar presente en el 15-50 % de las infecciones respiratorias que se producen en adultos y niños. El espectro de la enfermedad puede variar desde una enfermedad leve de las vías respiratorias superiores hasta una neumonía grave. La neumonía aguda debida a los virus de la gripe A o B puede ser mortal, especialmente cuando se produce concomitantemente con infecciones microbianas secundarias en pacientes de edad avanzada o inmunocomprometidos.

20 Los virus de la influenza se han asociado a brotes nosocomiales de infecciones respiratorias en salas de pediatría y geriatría ("ancianos") y han provocado hospitalizaciones prolongadas y un aumento de la morbilidad y la mortalidad.

25 Los síntomas de la COVID-19 son variados, pero suelen incluir fiebre, tos, fatiga, dificultades respiratorias y pérdida del olfato y el gusto. Los síntomas comienzan entre uno y catorce días después de la exposición al virus. De las personas que desarrollan síntomas perceptibles, la mayoría (81 %) desarrolla síntomas de leves a moderados (hasta neumonía leve), mientras que el 14 % desarrolla síntomas graves (disnea, hipoxia o más del 50 % de afectación pulmonar en la imagenología) y el 5 % sufre síntomas críticos (insuficiencia respiratoria, shock o disfunción multiorgánica). Al menos un tercio de las personas infectadas por el virus son asintomáticas y no desarrollan síntomas perceptibles en ningún momento, pero aun así pueden propagar la enfermedad.

30 El virus que causa la COVID-19 se propaga principalmente cuando una persona infectada está en estrecho contacto con otra. Las pequeñas gotas y aerosoles que contienen el virus pueden propagarse desde la nariz y la boca de una persona infectada al respirar, toser, estornudar, cantar o hablar. Otras personas se infectan si el virus entra en su boca, nariz u ojos. El virus también puede propagarse a través de superficies contaminadas, aunque no se cree que ésta sea la principal vía de transmisión. La vía exacta de transmisión rara vez se demuestra de forma concluyente, pero la infección se produce principalmente cuando las personas están cerca unas de otras durante el tiempo suficiente. Las personas infectadas pueden transmitir el virus a otra persona hasta dos días antes de que ellas mismas presenten síntomas, al igual que las personas que no experimentan síntomas. Las personas siguen siendo infecciosas hasta diez días después de la aparición de los síntomas en los casos moderados y hasta 20 días en los casos graves.

40 La COVID-19 deja a los individuos en la incertidumbre sobre si están infectados, ya que el periodo de latencia puede ser de hasta 14 días. Además, muchas personas infectadas son asintomáticas. Así, el individuo puede estar propagando el virus a otras personas sin ser consciente de ello. Además, algunas personas no están dispuestas a vacunarse o a vacunar a sus hijos. Por ello, las autoridades sanitarias necesitan una alternativa a la vacunación, utilizada habitualmente para controlar la pandemia.

45 Los virus del herpes simple 1 y 2 (VHS-1 y VHS-2), también conocidos por sus nombres taxonómicos alfa herpesvirus humano 1 y alfa herpesvirus humano 2, son dos miembros de la familia *Herpesviridae* humana, un conjunto de nuevos virus con envoltura que producen infecciones víricas en la mayoría de los seres humanos. Tanto el VHS-1 (que produce la mayoría de los herpes labiales) como el VHS-2 (que produce la mayoría de los herpes genitales) son comunes y contagiosos. Se pueden propagar cuando una persona infectada empieza a excretar el virus.

50 Aproximadamente 67 % de la población mundial menor de 50 años tiene el VHS-1. Se cree que aproximadamente el 47,8 % y el 11,9 % tienen VHS-1 y VHS-2, respectivamente. Dado que puede transmitirse a través de cualquier contacto íntimo, es una de las infecciones de transmisión sexual más comunes.

55 Los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) son dos especies con envoltura de lentivirus (un subgrupo de retrovirus) que infectan a los humanos. Con el tiempo, causan el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), una condición en la que el fallo progresivo del sistema inmunitario permite que prosperen infecciones oportunistas y cánceres potencialmente mortales. Sin tratamiento, el tiempo medio de supervivencia tras la infección por VIH se estima entre 9 y 11 años, dependiendo del subtipo de VIH.

60 Además, los enfoques vacunales contra el VIH y el VHS han fracasado hasta ahora y los elevados costes del tratamiento antiviral excluyen del tratamiento a una gran parte de la población mundial. Necesitamos formas de restringir la propagación del virus, incluidas formas de que las mujeres se protejan del VIH-1 y del VHS. La infección por VHS-2 es un cofactor de la transmisión y adquisición del VIH-1, por lo que se sugiere el control del VHS-2 como medio para reducir la transmisión del VIH-1.

65

Una etapa muy temprana de la infección vírica es la entrada vírica, cuando el virus se adhiere a la célula hospedera y entra en ella. Se están desarrollando varios fármacos "inhibidores de la entrada" o "bloqueadores de la entrada" para luchar contra el VIH. El VIH se dirige principalmente a los leucocitos del sistema inmunitario conocidos como "células T auxiliares" e identifica estos objetivos a través de los receptores de superficie de las células T denominados "CD4" y "CCR5". Los intentos de interferir en la unión del VIH con el receptor CD4 no han conseguido impedir que el VIH infecte a los linfocitos T auxiliares, pero se sigue investigando para intentar interferir en la unión del VIH con el receptor CCR5 con la esperanza de que sea más eficaz.

El citomegalovirus (CMV) es un género de virus con envoltura del orden Herpesvirales, en la familia *Herpesviridae*, en la subfamilia *Betaherpesvirinae*. Los humanos y los monos son sus hospederos naturales. Las 11 especies de este género incluyen el betaherpesvirus humano 5 (HCMV, citomegalovirus humano, HHV-5), que es la especie que infecta a los humanos. Entre las enfermedades asociadas al VHH-5 se encuentran la mononucleosis y la neumonía. En la literatura médica, la mayoría de las menciones del CMV sin más especificación se refieren implícitamente al CMV humano.

Roodabeth B. et al. "An evaluation of Traditional Persian Medicine", publicado el 25 de nov. de 2020, ofrece una revisión de un efecto médico de las plantas tradicionales persas, entre ellas el fenogreco (es decir, *Trigonella foenum-graecum*) y su uso para tratar una enfermedad inducida por virus. Sen Debanjan et al.: "Identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease and spike receptor from 10 important spices through structure-based virtual screening and molecular dynamic study", JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE & DYNAMICS, vol. 40, no. 2, 18 de septiembre de 2020 (2020-09-18), divulga que los compuestos encontrados en el fenogreco han demostrado poseer un efecto inhibidor sobre la proteasa principal y el receptor espiga del SARS-CoV-2 en ensayos *in vitro*.

Breve descripción

La presente invención se define mediante las reivindicaciones.

Es un objetivo proporcionar una composición farmacéutica para uso en un método de tratamiento de una enfermedad inducida por virus, en donde la composición comprende un extracto de *Trigonella foenum-graecum* y opcionalmente aditivos farmacéuticamente aceptables, en donde el método comprende la administración de entre 20 mg y 250 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum* al menos una vez al día.

La *Trigonella foenum-graecum* (también denominada en la presente fenogreco o TFG) es una hierba anual perteneciente a la familia de las leguminosas. La semilla de TFG es uno de los principales componentes del curry y forma parte de la cocina tradicional india y asiática. La TFG se considera seguro como componente alimentario humano, potenciador del sabor y agente colorante. La semilla de TFG es rica en fitoquímicos, como proteínas, saponina esteroideal, flavonoides, ácidos tánicos, ácido esteárico, aceites vegetales, alcaloide trigonelina y 4-hidroxiisoleucina.

El extracto de TFG utilizado en la composición farmacéutica de la presente invención también se considera seguro y puede utilizarse como componente alimentario humano. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser administrada libremente al paciente sin preocupaciones de riesgo. Como ocurre con todos los compuestos químicos, existe un nivel tóxico, pero aún no se ha detectado.

La presente invención ofrece ventajosamente a las personas que aún no se han vacunado, o son reacias a vacunarse contra enfermedades para las que existen actualmente vacunas, una alternativa a las vacunas tradicionales. La prevención o el tratamiento de, por ejemplo, la COVID-19 permite a las personas asintomáticas participar de forma ventajosa y segura en actividades sociales y laborales en grupos formados por individuos vulnerables a la enfermedad sin temor a propagar el virus.

Las características de las reivindicaciones independientes permiten alcanzar los objetivos anteriores y otros. Otras formas de implementación se desprenden de las reivindicaciones dependientes y de la descripción.

Según un primer aspecto, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método para el tratamiento de enfermedades inducidas por virus, que comprende un extracto de *Trigonella foenum-graecum* y opcionalmente aditivos farmacéuticamente aceptables.

En una posible realización del primer aspecto, el virus es un virus con envoltura, un Coronavirus, un Simplexvirus, un Citomegalovirus, un Orthomixovirus y/o un Retrovirus. Estos géneros son virus con envoltura, es decir, virus que tienen una membrana lipídica.

En una posible realización del primer aspecto, el virus es un Coronavirus relacionado con el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV), como SARS-CoV-1 o SARS-CoV-2, un Virus del Herpes Simple 1 o 2, un Betaherpesvirus Humano 5 (HCMV, citomegalovirus humano, HHV-5), un virus de la influenza A, B, C o D y/o un Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 o 2 (VIH-1, VIH-2).

- En una posible realización del primer aspecto, dicho SARSr-CoV es una variante de linaje genético de preocupación (VOC), una variante bajo vigilancia o una variante de interés (VOI) según la definición de la Organización Mundial de la Salud. Se conoce como VOC a una variante del SRAS-CoV-2 que cumple la definición de VOI (véase más adelante) y que, mediante una valoración comparativa, se ha demostrado que está asociada a uno o más de los siguientes cambios en un grado de importancia para la salud pública mundial:
- Aumento de la transmisibilidad o cambio perjudicial en la epidemiología de la COVID-19; O
  - Aumento de la virulencia o cambio en la presentación clínica de la enfermedad; O
  - Disminución de la eficacia de las medidas sociales y de salud pública o de los diagnósticos, vacunas y terapias disponibles.
- Una VOI se conoce como variante del SARS-CoV-2:
- con cambios genéticos que se predice o se sabe que afectan a las características del virus, como la transmisibilidad, la gravedad de la enfermedad, el escape inmunitario o el escape diagnóstico o terapéutico; y
  - Identificado como causante de una transmisión comunitaria significativa o de múltiples conglomerados de la COVID-19, en múltiples países con un aumento de la prevalencia relativa junto con un aumento del número de casos a lo largo del tiempo, u otros impactos epidemiológicos aparentes que sugieran un riesgo emergente para la salud pública mundial.
- Se conoce como VUM una variante del SARS-CoV-2 con cambios genéticos que se sospecha que afectan a las características del virus, con algunos indicios de que puede suponer un riesgo en el futuro, pero las pruebas de su impacto fenotípico o epidemiológico no están claras en la actualidad, por lo que es necesario reforzar la vigilancia y repetir la valoración a la espera de nuevas pruebas.
- Se espera que la comprensión de los impactos de las variantes pueda evolucionar rápidamente, y que las Variantes bajo Vigilancia designadas puedan ser fácilmente añadidas/eliminadas. Véase <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/?msclkid=6740ed46b67611ec92afe7354be42af5> para mayor detalles.
- En una posible realización del primer aspecto, el virus SARSr-CoV es un SARS-CoV-2 de tipo silvestre o una variante de linaje genético Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2), Mink (variante de grupo N439K/Y453F), y/u Ómicron (B.1.1.529), Épsilon (B.1.427/B.1.429), Zeta (P.2), Eta (B.1.525), Theta (P.3), Iota (B.1.526), Kappa (B.1.617.1), Lambda (C.37) o Mu (B.1.621).
- En una posible realización del primer aspecto, la enfermedad es un síndrome respiratorio agudo grave causado por el SARS-CoV-1 o el SARS-CoV-2, como la COVID-19, herpes labial, causado por el virus del herpes simple 1, herpes genital, causado por el virus del herpes simple 2 mononucleosis, neumonía, ambas causadas por el Betaherpesvirus Humano 5, influenza (gripe), causada por los virus de la Influenza A, B, C y/o D, y/o síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), causado por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 o 2.
- En una posible realización del primer aspecto, la composición farmacéutica comprende además bentonita. En algunas formulaciones de la composición farmacéutica, la mezcla del extracto de *Trigonella foenum-graecum* y la bentonita se comporta de forma sinérgica, es decir, el efecto del extracto se potencia con la presencia de la bentonita.
- En una posible realización del primer aspecto de la composición farmacéutica, la bentonita comprende 50 % en peso o más de esmectita.
- En una posible realización del primer aspecto, la composición farmacéutica comprende de 1:10 a 10:1 en peso de materia seca de extracto de *Trigonella foenum-graecum* en relación con la bentonita.
- En una realización de la invención, el peso del extracto de *Trigonella foenum-graecum* en la composición farmacéutica es de al menos 0,01 % en peso de la composición farmacéutica.
- En una posible realización del primer aspecto, el peso del extracto de *Trigonella foenum-graecum* es a lo sumo aproximadamente el 30 % en peso de la composición farmacéutica, como a lo sumo aproximadamente el 25 % en peso de la composición farmacéutica, como a lo sumo aproximadamente el 15% en peso de la composición farmacéutica, como a lo sumo aproximadamente el 5% en peso de la composición farmacéutica, como a lo sumo aproximadamente el 1 % en peso de la composición farmacéutica, como a lo sumo aproximadamente el 0,5 % en peso de la composición farmacéutica, como a lo sumo aproximadamente el 0,25 % en peso de la composición farmacéutica, como a lo sumo aproximadamente el 0,15 % en peso de la composición farmacéutica.

La composición farmacéutica de la invención puede formularse de cualquier forma adecuada para la vía de administración. En una determinada realización de la composición farmacéutica, se formula como una disolución para pulverizar, un medicamento tópico, como una crema o una loción, una gragea para la garganta o un comprimido. Cuando la composición farmacéutica se administra a una membrana mucosa, suele ser en forma de aerosol o de gragea. Por lo general, se prefiere un aerosol para la administración a la membrana mucosa del pulmón y las regiones nasales, mientras que una gragea para la garganta o un comprimido bucodispersable son formas de administración adecuadas para las infecciones presentes en la garganta. Generalmente, la disolución para pulverización es para administración nasal o pulmonar.

De acuerdo con una realización de la composición farmacéutica, la gragea o comprimido es un comprimido bucodispersable.

En una determinada forma de aplicación del primer aspecto, el comprimido bucodispersable, la gragea o el comprimido se administran por vía sublingual o bucal. Convenientemente, cualquiera de estas formas administradas sublingualmente se disuelve durante un período de tiempo de 1 a 20 minutos.

En una posible forma de realización del primer aspecto, la composición farmacéutica comprende al menos 20 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 30 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 40 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 50 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 60 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como mínimo 70 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 80 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 90 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 100 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 110 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 120 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 130 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 140 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 150 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 160 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 170 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 180 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 190 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 200 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 210 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 220 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 230 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como al menos 240 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*, como 250 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum*.

En una posible realización del primer aspecto, la composición farmacéutica se administra al menos una vez al día, como dos veces al día, como tres veces al día, como cuatro veces al día, como cinco veces al día.

En una posible realización del primer aspecto, la composición farmacéutica disminuye ventajosamente la capacidad de replicación del virus. Dicho mecanismo podría incluir uno o más de los siguientes: disminución de la capacidad del virus para adherirse a una célula hospedera, penetración en la célula hospedera, inhibición de la transcripción del ácido nucleico en la célula hospedera y/o liberación del virus y, por tanto, propagación de célula a célula.

En una posible realización del primer aspecto, la composición farmacéutica disminuye ventajosamente la capacidad del virus para adherirse a una célula hospedera. Dicha estrategia es una de las estrategias antivirales que se basan en la interferencia con la capacidad de un virus para infiltrarse en una célula objetivo. El virus debe pasar por una secuencia de pasos para penetrar en una célula hospedera, empezando por unirse o adherirse a una molécula "receptora" específica de la superficie de la célula hospedera y terminando con el virus "desencapsulándose" dentro de la célula y liberando su contenido. Los virus que tienen una envoltura lipídica también deben fusionar su envoltura con la célula objetivo, o con una vesícula que los transporte al interior de la célula antes de que puedan desencapsularse.

La etapa de fijación de la replicación vírica puede inhibirse de dos maneras:

1. Uso de agentes que imitan la proteína asociada al virus (VAP) y se unen a un receptor celular. Esto puede incluir componentes de extracto de *Trigonella foenum-graecum* de acuerdo con la invención, que pueden actuar ventajosamente como ligandos naturales del receptor.

2. Uso de agentes que imitan el receptor celular y se unen a la VAP. Esto puede incluir componentes de extracto de *Trigonella foenum-graecum* de acuerdo con la invención, que pueden actuar ventajosamente como miméticos de receptores extraños.

En una posible forma de implementación del primer aspecto, la composición farmacéutica disminuye ventajosamente la capacidad del virus para penetrar en una célula hospedera. Una etapa muy temprana de la infección vírica es la entrada vírica, cuando el virus se adhiere a la célula hospedera y entra en ella. El VIH, por ejemplo, infecta una célula a través de la fusión con la membrana celular, lo que requiere dos participantes moleculares celulares diferentes, CD4 y un receptor de quimiocinas (que difiere según el tipo de célula). Potencialmente, uno de los beneficios del uso de un agente eficaz de bloqueo o inhibición de la entrada es que potencialmente no solo puede prevenir la propagación del

virus dentro de un individuo infectado, sino también la propagación de un individuo infectado a uno no infectado. Otra posible ventaja del enfoque terapéutico de bloquear la entrada vírica (a diferencia del enfoque actualmente dominante de la inhibición enzimática vírica) es que puede resultar más difícil para el virus desarrollar resistencia a esta terapia que para el virus mutar o desarrollar sus protocolos enzimáticos.

5 Los agentes antipenetración actúan bloqueando una bolsa en la superficie del virus que controla el proceso de desprendimiento/penetración. Este bolsillo es similar en la mayoría de las cepas de influenza, por ejemplo.

10 En una posible forma de implementación del primer aspecto, la composición farmacéutica disminuye ventajosamente la capacidad de la membrana lipídica para permanecer intacta. En tal caso, la disminución de la integridad de la envoltura vírica puede conducir a la aparición de agujeros y/o reducción de la capacidad de fusión con la membrana celular de una célula hospedera, lo que puede disminuir ventajosamente la capacidad de unirse y penetrar en una célula hospedera. Además, las envolturas pueden ayudar a los virus a evitar el sistema inmunitario del huésped, por lo tanto, y sin el deseo de limitarse a ninguna hipótesis particular, la disminución de la integridad de la envoltura vírica puede conducir a una disminución de la capacidad del virus para evadir el sistema inmunitario, lo que conduce a la remisión de la enfermedad.

20 En una posible forma de implementación del primer aspecto, la composición farmacéutica disminuye ventajosamente la capacidad del virus para replicarse y/o transcribir su material genético dentro de la célula hospedera. Los componentes de extracto de *Trigonella foenum-graecum* de acuerdo con la invención pueden actuar como análogos de nucleótidos o nucleósidos, que pueden desactivar ventajosamente las enzimas que sintetizan el ARN o ADN una vez que se incorpora el análogo, y/o inhibir las enzimas integrasa que integran el ADN sintetizado en el genoma de la célula hospedera.

25 En una posible forma de implementación del primer aspecto, la composición farmacéutica disminuye ventajosamente la capacidad del virus para traducir y procesar correctamente los péptidos nacientes dentro de la célula hospedera. En una posible forma de implementación del primer aspecto, la composición farmacéutica se dirige ventajosamente a hélices de ARNcd largas.

30 En una posible forma de implementación del primer aspecto, la composición farmacéutica disminuye ventajosamente la capacidad del virus para liberar virus completos de la célula hospedera. De manera adecuada, el bloqueo de una molécula llamada neuraminidasa que se encuentra en la superficie de los virus de la gripe, y también parece ser constante en un amplio intervalo de cepas de gripe, puede prevenir ventajosamente la liberación de partículas virales.

35 En una posible forma de implementación del primer aspecto, la composición farmacéutica efectúa ventajosamente un cambio en una membrana celular de una célula hospedera. Este cambio puede comprender un cambio conformacional de un componente de membrana proteica, un cambio en el potencial de membrana de esta membrana o un aumento en la permeabilidad de esta membrana a iones y/o moléculas. Estos cambios pueden conducir a una disminución en la unión, penetración y/o liberación de virus.

40 El extracto de *Trigonella foenum-graecum* se puede obtener mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica para extraer componentes de materiales vegetales. En un segundo aspecto de la invención, el extracto se puede obtener mediante los pasos de:

- 45 a) poner en contacto semillas de *Trigonella foenum-graecum* y un solvente en una mezcla,  
 b) incubar esta mezcla durante al menos 2 horas, tal como durante al menos 3 horas, hasta que el embrión se libere de las semillas  
 50 c) opcionalmente calentar esta mezcla, y  
 d) recuperar un extracto líquido de esta mezcla mediante la separación del material vegetal restante de la mezcla.

55 De manera adecuada, la incubación en el paso b) puede continuar hasta que el brote sea visible.

El método para preparar el extracto puede comprender además el paso de retirar el disolvente mediante secado por pulverización. Por lo tanto, el extracto de *Trigonella foenum-graecum* en la composición farmacéutica puede ser partículas secadas por pulverización.

60 En una posible forma de implementación del segundo aspecto, el método comprende además

- f) congelar antes o después del calentamiento en c) durante al menos 3 horas, preferiblemente más de 6 horas, tal como 12 horas, y  
 65 g) opcionalmente, calentar la mezcla antes de la recuperación del extracto.

## Descripción detallada

## Extracto

5 Un método para la preparación de un extracto de *Trigonella foenum-graecum* se puede encontrar en WO 08/125120. De acuerdo con la descripción de la publicación de la técnica anterior, las semillas de *Trigonella foenum-graecum* se sumergen en agua para iniciar el brote antes de la extracción. WO 17/207010 describe una composición que comprende una mezcla de extracto de *Trigonella foenum-graecum* y bentonita. Los documentos WO 08/125120 y WO 17/207010 se incorporan a la presente mediante esta referencia.

10 En un aspecto de la invención, el extracto de *Trigonella foenum-graecum* se deriva de material vegetal, tal como hojas, ramas, flores, semillas, etc. En una realización adecuada, este material vegetal es semillas obtenidas de *Trigonella foenum-graecum*.

15 El método para preparar este extracto puede comprender los siguientes pasos:

a) poner en contacto material vegetal de *Trigonella foenum-graecum* y un solvente en una mezcla,

20 b) incubar esta mezcla durante al menos 2 horas, tal como durante al menos 3 horas, hasta que el embrión se libere de las semillas

c) opcionalmente calentar esta mezcla, y

25 d) recuperar un extracto líquido de esta mezcla mediante la separación del material vegetal restante de la mezcla.

El material vegetal puede ser fresco, congelado, seco o combinaciones de los mismos. En la realización preferida, el material vegetal es semillas de *Trigonella foenum-graecum*, más preferentemente semillas secas de esta planta.

30 Con el fin de facilitar la extracción de los ingredientes activos del material vegetal, este material vegetal se empapa en un solvente, preferentemente agua. La mezcla de líquido y material vegetal se incuba durante al menos 2 horas, más preferentemente al menos 3 horas, preferentemente al menos 6 horas, incluso más preferentemente al menos 12 horas, tal como al menos 24 horas. La incubación usualmente se realiza a temperaturas entre 0 y 45 °C, adecuadamente a temperaturas entre 10 y 40 °C. La incubación debe continuar preferiblemente al menos hasta que el brote sea visible.

35 Posteriormente, la mezcla que comprende el material vegetal empapado en un líquido se calienta, preferentemente a una temperatura por encima de la coagulación de proteínas. En un determinado aspecto, la mezcla se hierve.

40 La mezcla comprende material vegetal y un solvente fluido. La relación en peso de este material vegetal y este líquido en esta mezcla es adecuadamente de 1 a 1, o preferentemente menos material vegetal en peso tal como 1 a 2, o menos material vegetal en peso tal como 1 a 3, o menos material vegetal en peso tal como 1 a 4, o menos material vegetal en peso tal como 1 a 5, o menos material vegetal en peso tal como 1 a 6, o menos material vegetal en peso tal como 1 a 7, o menos material vegetal en peso tal como 1 a 8, o menos material vegetal en peso tal como 1 a 9, o menos material vegetal en peso tal como 1 a 10. En una realización preferida, la relación en peso de este material vegetal y este líquido es de 1 a 6.

45 Durante el calentamiento de la mezcla, se puede agregar fluido adicional al menos una vez para compensar el líquido evaporado y el líquido absorbido por el material vegetal. El líquido se calienta preferentemente. El calentamiento puede terminarse cuando el embrión se libera de las semillas, lo que se asocia con un aumento de la viscosidad de la mezcla. De manera adecuada, el calentamiento no se continúa más de 10 minutos después de que el embrión haya sido liberado.

50 Opcionalmente, la mezcla se congela (preferentemente a -18 °C) antes o después del paso de calentamiento durante al menos 3 horas, preferentemente más de 6 horas, tal como 12 horas o más de 12 horas. Posteriormente, la mezcla se puede someter a una segunda ronda de calentamiento antes de la recuperación del extracto, por ejemplo, mediante el retiro del material vegetal restante. Se espera que el paso de congelación mejore aún más la liberación de los ingredientes activos del material vegetal.

60 El volumen de un extracto concentrado final que se origina a partir de ½ kg de material vegetal, tal como semillas, es de aproximadamente 2 litros.

65 Para su conservación, el extracto puede refrigerarse. Dependiendo de la aplicación, el extracto puede diluirse en agua o usarse tal cual. El extracto se puede concentrar adicionalmente mediante el retiro del solvente. El solvente se puede retirar o reducir mediante cualquier medio adecuado, tal como filtración por membrana, evaporación, precipitación, extracción, destilación azeotrópica, liofilización, secado por pulverización y combinaciones de los mismos. Las partículas secadas por pulverización pueden secarse posteriormente en un aparato de lecho fluido.

El extracto acuoso de *Trigonella foenum-graecum* tiene tendencia a oler a sotolon. El olor puede ser considerado desagradable por algunos usuarios y, por lo tanto, puede restringir la aplicación del extracto. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la cantidad de sotolon puede reducirse drásticamente mediante el secado por pulverización del extracto. Por lo tanto, el extracto acuoso se seca preferentemente mediante secado por pulverización para formar un polvo de fenogreco.

El extracto utilizado en la invención se puede purificar para aislar el o los ingredientes activos mediante cualquier método apropiado. Por lo tanto, el extracto se puede fraccionar mediante el uso de filtración en gel, HPCL, extracción, precipitación, etc. En un método actualmente útil, el extracto se fracciona usando HPLC. En un método específico, el o los ingredientes activos se incluyen en una fracción de extracto que se puede obtener mediante la realización de cromatografía de fase inversa en un Lichroprep RP-18 de tamaño B (40-63um) (Merck) del extracto base utilizando el siguiente gradiente: 0-1 min H<sub>2</sub>O/AcN 98:2, luego usando un gradiente constante de 1-40 min yendo al 100% y recolectando la fracción en el intervalo de tiempo entre 5 y 10 min. El solvente del extracto purificado se puede retirar o reducir mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente. En un aspecto de la invención, el extracto purificado se seca por pulverización.

En otro método de purificación específico, el extracto acuoso se puede tratar inicialmente con etanol para precipitar la mayoría de los residuos vegetales y polisacáridos del extracto. El precipitado se puede retirar mediante sedimentación o centrifugación. Para un almacenamiento más fácil, el solvente se puede evaporar o retirar de otro modo para producir un polvo. De manera alternativa, el extracto tratado con etanol se puede usar directamente en el proceso posterior. El polvo se puede suspender posteriormente en agua y acidificar a pH 1-4, preferentemente pH 2, con un ácido fuerte tal como ácido clorhídrico. El extracto acidificado se extrae con un solvente orgánico inmiscible en agua como el heptano. Después de la agitación, la capa orgánica y la capa acuosa se separan y la capa acuosa se trata con un agente alcalino para obtener un pH superior a pH 9, preferiblemente aproximadamente pH 10. La fase acuosa alcalina se extrae nuevamente con un solvente orgánico inmiscible en agua y se agita. Se obtiene un polvo sólido a partir de la fase orgánica recuperada mediante el retiro del solvente mediante evaporación, tal como mediante evaporación a presión reducida o secado por pulverización.

### 30 Bentonita

La bentonita es una arcilla de filosilicato de aluminio absorbente. La bentonita usualmente se forma a partir de la intemperie o la diagénesis de la ceniza volcánica. Los diferentes tipos de bentonita generalmente llevan el nombre del ion dominante, es decir, bentonita de sodio, bentonita de potasio, bentonita de aluminio, bentonita de hierro y bentonita de calcio. En general, se prefiere la bentonita de sodio y calcio.

La bentonita de sodio se caracteriza por un alto poder de hinchamiento, a menudo absorbiendo hasta varias veces su masa seca en agua. La bentonita de calcio es un adsorbente de iones y otros componentes y se caracteriza por un poder de hinchamiento algo menor. La bentonita de calcio puede tener el ion de calcio intercambiado con el ion de sodio para convertirlo en bentonita de sodio (denominado beneficio de sodio o activación de sodio) para exhibir muchas de las propiedades de la bentonita de sodio mediante un proceso de intercambio iónico. Esta transformación se puede lograr agregando un compuesto de sodio soluble a la Ca-bentonita.

Como la bentonita es una arcilla natural, puede contener una mezcla compleja de componentes. En general, la bentonita de la presente invención comprende arcilla de esmectita. La esmectita se puede seleccionar, por ejemplo, entre montmorillonita, beidelita, sauconita, hectorita de estevensita, saponita, nontronita, vermiculita y mezclas de las mismas. También puede estar presente en la arcilla de bentonita caolín, ilita y/o clorita. La cantidad de esmectita en la bentonita es generalmente superior al 50% en peso, tal como superior al 70 % en peso, y adecuadamente superior al 80 % en peso.

La esmectita se define en la mineralogía de arcilla como una arcilla 2:1, que consiste en una lámina octaédrica intercalada entre dos láminas tetraédricas. Las esmectitas se componen de capas de láminas de aluminosilicato cargadas negativamente unidas por contraiones de equilibrio de carga tal como Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. En presencia de agua, estos cationes tienden a hidratarse, lo que obliga a las capas de arcilla a separarse en una serie de pasos discretos. Esto hace que la esmectita se hinche.

Se entenderá que la bentonita utilizada en la composición de la presente invención puede ser bentonita de origen natural y no modificada, o cualquier fracción de la misma enriquecida en un cierto componente y opcionalmente modificada químicamente, especialmente por intercambio de iones. La montmorillonita es hidróxido de silicato de sodio, calcio, aluminio y magnesio hidratado que tiene la fórmula (Na,Ca)<sub>0,33</sub>(Al,Mg)<sub>2</sub>(Si<sub>4</sub>O<sub>10</sub>)(OH)<sub>2</sub>·nH<sub>2</sub>O. En una realización, la arcilla de bentonita es montmorillonita.

En entornos acuosos, cada partícula de esmectita se compone de una multitud de plaquetas submicroscópicas apiladas en forma de sándwich con una capa de agua entre cada una. Una sola plaqueta tiene aproximadamente un nanómetro de espesor y hasta varios cientos de nanómetros de diámetro. Una vez que la arcilla está hidratada, los bordes de las plaquetas débilmente positivos se unen a las caras de las plaquetas cargadas negativamente. Se forma

una estructura coloidal tridimensional, que explica la reología característica impartida por estas arcillas, es decir, un aumento en la viscosidad.

La cantidad de esmectita en la composición generalmente no es superior al 50% en peso. Para la mayoría de los propósitos prácticos, se utiliza una cantidad de aproximadamente 30% en peso o menos de arcilla de bentonita para evitar una viscosidad, que no es deseable desde el punto de vista del usuario final. De manera adecuada, la cantidad de esmectita es 10% en peso o menos, tal como 5% en peso o menos. Para obtener un efecto reductor de microorganismos, incluso una pequeña cantidad de bentonita es adecuada. En general, la cantidad de esmectita es 0.0001% en peso o superior, tal como 0,001% en peso, 0,01% en peso, 0,1% o superior y preferiblemente 0,3% en peso y superior.

Las arcillas de bentonita están disponibles comercialmente bajo varios nombres comerciales, incluidos Van Gel B, Veegum, Veegum F, Veegum HV, VeegumK, Veegum HS, Veegum Ultra, Veegum D, Veegum Pure, Veegum Ultra, Veegum PRO, Veegum plus, Veegum T, Van Gel B, Van Gel C, Van Gel ES, Van Gel O, todas las marcas comerciales de R.T. Compañía Vandebilt. Las arcillas de bentonita también están disponibles en Amcol International.

La arcilla de esmectita también se puede proporcionar sintéticamente, por ejemplo, siguiendo el método de Nakazawa, H., Yamada, H. y Fujita, T. (1992): Síntesis cristalina de esmectita aplicando presión y temperatura muy altas, Applied Clay Science, 6, 395-401.

La bentonita se encuentra en muchas áreas geológicas del mundo. Según el Servicio Geológico Británico, la bentonita se produce en al menos 44 países. Por lo tanto, la bentonita de sodio se produce, entre otros, en EUA en Dakota del Sur y en Wyoming. La bentonita de sodio también se produce en Turquía en la región de Tokat Resadiye. La bentonita mixta de sodio/calcio se extrae en Grecia, Australia, India, Rusia y Ucrania. La bentonita de calcio se extrae en Mississippi y Alabama, Alemania, Grecia, Turquía, India y China. En un cierto aspecto de la invención, se prefiere una bentonita producida en Dinamarca cerca de Rødby.

El extracto de *Trigonella foenum-graecum* y la bentonita se pueden mezclar en cualquier proporción que proporcione el efecto deseado. En un cierto aspecto de la invención, el extracto de *Trigonella foenum-graecum* a bentonita se mezcla en una relación en peso entre 1:10 a 10:1. De manera adecuada, la relación en peso entre el extracto de *Trigonella foenum-graecum* y la bentonita es de al menos 2:10, tal como 3:10. De manera similar, la relación en peso de bentonita a extracto de *Trigonella foenum-graecum* es preferiblemente al menos 2:10, tal como 3:10. En un aspecto preferido, la relación en peso entre el extracto de *Trigonella foenum-graecum* y la bentonita está entre 4:10 y 10:4.

### Formulación

La composición puede comprender una variedad de componentes adicionales además del extracto de *Trigonella foenum-graecum*. De acuerdo con un cierto aspecto de la invención, cuando la composición farmacéutica comprende bentonita, el peso de la mezcla de extracto de *Trigonella foenum-graecum* y bentonita es de al menos 0,01% en peso de la formulación final, tal como al menos 0,05% en peso y adecuadamente al menos 0,1% en peso.

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede formular de varias maneras diferentes, dependiendo del propósito del medicamento particular y el tipo de administración. Está dentro del alcance de un experto en la técnica formular composiciones que estén de acuerdo con el tipo de administración preferido.

La composición que comprende el extracto y opcionalmente bentonita de acuerdo con la invención se puede preparar mediante cualquier técnica convencional, por ejemplo, como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, editado por E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19ª edición, Easton, Pa.

La composición puede comprender aditivos farmacéuticamente aceptables tal como cualquier aditivo farmacéuticamente aceptable usado convencionalmente, que debe seleccionarse de acuerdo con la formulación específica, la vía de administración prevista, etc. Por ejemplo, los aditivos farmacéuticamente aceptables pueden ser cualquiera de los aditivos mencionados en Nema et al, 1997. Además, el aditivo farmacéuticamente aceptable puede ser cualquier aditivo aceptado de la "lista de ingredientes inactivos" de la FDA, que se puede descargar de <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/inactive-ingredients-database-download>.

Una realización preferida de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica formulada para su aplicación en un área mucosa, tal como la mucosa presente en la cavidad nasal, cavidad bucal, laringe, tráquea y cavidad torácica.

Las composiciones para administración tópica pueden incluir componentes farmacéuticamente aceptables tal como portadores, agentes tensioactivos, conservantes, agentes estabilizantes, amortiguadores, excipientes y emulsionantes adecuados para este tipo de administración. Los componentes adecuados para los sistemas de administración tópica se eligen preferiblemente de componentes que no causan irritación o dolor excesivo o inevitable al receptor. Los portadores incluyen diluyentes y proporcionan el medio en el que se disuelven, dispersan o distribuyen los constituyentes farmacéuticos.

La composición de acuerdo con la invención puede comprender, pero no se limita a, un portador tal como una base líquida acuosa, emulsión o suspensión de partículas sólidas en un líquido.

5 La composición de la invención se puede aplicar a un área mucosa y el o los componentes activos pueden ejercer su acción sobre la mucosa o después de la penetración de la mucosa. La disponibilidad tópica de los compuestos activos depende de varios factores, incluida su capacidad para disolverse en el portador (gel, crema - hidrófilo) y su capacidad para penetrar en la mucosa, lo que requiere un cierto equilibrio hidrófobo-hidrófilo. Las formulaciones pueden requerir la adición de excipientes, tal como potenciadores de la permeación y solubilizantes para facilitar cualquiera o ambos de los procesos de transporte (disolución en el vehículo y difusión a través de la mucosa). Se ha descrito que los aditivos, tal como alcoholes, alcoholes grasos, ácidos grasos, mono- di- o tri-glicéridos, monoésteres de glicerol, ciclodextrina y derivados, polímeros, bioadhesivos, terpenos, agentes quelantes y agentes tensioactivos aumentan la administración transmucosa de fármacos. Los alcoholes incluyen, pero no se limitan a, etanol, 2-propanol y polioles tal como polietilenglicol (PEG), propilenglicol, glicerol, propanodiol. Está dentro de la presente invención hacer uso de estos excipientes.

Cualquier método, no limitado a lo mencionado anteriormente, para aumentar la administración transmucosa está dentro del alcance de la presente invención. Por lo tanto, el medicamento de acuerdo con la presente invención puede comprender agentes tensioactivos tal como agentes tensioactivos iónicos y/o no iónicos. Los agentes tensioactivos no iónicos adecuados incluyen, por ejemplo: etoxilatos de alcoholes grasos (alquilpolietilenglicoles); alquilfenol polietilenglicoles; alquil mercaptano polietilenglicoles; etoxilatos de aminas grasas (alquilaminopolietilenglicoles); etoxilatos de ácidos grasos (acilpolietilenglicoles); etoxilatos de polipropilenglicol (Pluronic); polímero de carboxivinilo (Polygel® HP), alquilolamidas de ácidos grasos (polietilenglicoles de amida de ácido graso); alquil poliglicósidos, N-alquil-, N-alcoxipoli-hidroxi amida de ácido graso, en particular N-metil-glucamida de ácido graso, ésteres de sacarosa; ésteres de sorbitol, ésteres de éteres de poliglicol de sorbitol y lecitina. Los agentes tensioactivos iónicos incluyen, por ejemplo, lauril sulfato de sodio, laurato de sodio, polioxietilen-20-éter etílico, Laureth-9, dodecilsulfato de sodio (SDS) y dioctil sulfosuccinato de sodio.

Los métodos para mejorar la administración de fármacos a través de la administración mucosa se pueden aplicar con la presente invención e incluyen cualquier medio para aumentar la absorción, minimizar el metabolismo y/o prolongar la vida media del ingrediente activo del medicamento tal como el extracto de *Trigonella foenum-graecum*. Estos medios pueden incluir el uso de transportadores del tipo liposomas, ISCOM, nanopartículas, microesferas, hidrogeles, organogeles, polímeros u otras técnicas de microencapsulación.

35 Comprimidos bucodispersables:

Los comprimidos bucodispersables han mejorado el cumplimiento del paciente y tienen algunas ventajas adicionales en comparación con otras formulaciones orales. También son formas de dosificación unitaria sólidas, que se desintegran en la boca en un minuto en presencia de saliva debido a los súper desintegrantes en la formulación. Por lo tanto, este tipo de administración de medicamentos ayuda a una administración peroral adecuada en la población pediátrica y geriátrica donde la deglución es un problema. Varios científicos han preparado comprimidos bucodispersables siguiendo varios métodos.

45 Sin embargo, el método de preparación más común es el método de compresión. Otros métodos especiales son el moldeo, la granulación en estado fundido, proceso de transición de fase, sublimación, liofilización, secado por pulverización y método efervescente. Dado que estos comprimidos se disuelven directamente en la boca, su sabor también es un factor importante. Se han tomado varios enfoques para enmascarar el sabor amargo de un fármaco. Un número de científicos han explorado varios medicamentos en este campo. Al igual que todas las demás formas de dosificación sólidas, también se evalúan en el campo de la dureza, friabilidad, tiempo de humectación, absorción de humedad, prueba de desintegración y prueba de disolución.

Los métodos para la preparación de comprimidos bucodispersables incluyen: Métodos de moldeo: Los comprimidos formados por el proceso de moldeo son de estructura altamente porosa, lo que resulta en una alta tasa de desintegración y disolución. Este proceso incluye humedecer, disolver o dispersar los fármacos con un solvente y luego moldear la mezcla húmeda en comprimidos aplicando una presión más baja en el moldeo por compresión, pero siempre más baja que la compresión convencional del comprimido. La mezcla en polvo se puede tamizar antes de la preparación para aumentar la disolución. Los comprimidos moldeados tienen baja resistencia mecánica, lo que resulta en erosión y rotura durante la manipulación.

60 Métodos de compactación: También existen métodos convencionales para la preparación de comprimidos tal como granulación en seco, granulación en húmedo y compresión directa para la preparación de tabletas bucodispersables. Algunos súper desintegrantes importantes, que se usan durante la preparación de comprimidos bucodispersables, son crospovidona, croscarmelosa de sodio, alginato de sodio, derivados del ácido acrílico. El glicolato de almidón de sodio se puede usar como súper desintegrantes, así como celulosa microcristalina y crospovidona. al 2%-10%. Se ha encontrado que la preparación por método de compresión junto con la adición de súper desintegrantes en la concentración correcta obedece a todas las propiedades de los comprimidos bucodispersables.

Método de secado por pulverización: Los comprimidos bucodispersables están hechos de gelatina hidrolizada o no hidrolizada como agente de soporte para la matriz, manitol como agente a granel y glicolato de almidón de sodio o croscarmelosa de sodio como agente desintegrante. Para mejorar la desintegración y disolución, se utilizan ácido cítrico y bicarbonato de sodio. Finalmente, la formulación se seca por pulverización en un secador por pulverización. Los comprimidos bucodispersables preparados a través de este método se desintegran en menos de 20 segundos.

Método de liofilización: Este es un proceso muy popular para la preparación de comprimidos bucodispersables. Los comprimidos preparados por este proceso tienen baja resistencia mecánica, poca estabilidad a mayor temperatura y humedad, pero una estructura amorfa brillante que resulta en un producto altamente poroso y liviano. Hay varias patentes sobre esta tecnología en particular.

En la medida en que la composición farmacéutica se formula como una solución para pulverización o una pastilla, se pueden usar uno o más de los siguientes aditivos en la formulación: etanol, alantoína, solución de amoníaco, ácido cítrico anhidro, ácido ascórbico, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, alcohol bencílico, betadex, ácido bórico, hidroxianisol butilado, isoparafina C13-14/laureth-7/poliacrilamida, copolímero de arbómero tipo b (alil pentaeritritol reticulado), homopolímero de carbómero, homopolímero de carbómero tipo a (alil pentaeritritol reticulado), homopolímero de carbómero tipo b (alil pentaeritritol reticulado), homopolímero de carbómero tipo b (alil sacarosa reticulada), homopolímero de carbómero tipo c (alil pentaeritritol reticulado), carboximetilcelulosa de sodio, aceite de ricino, monohidrato de ácido cítrico, caprilcaprato de cocoilo, colágeno, copoliol de ciclometicona/dimeticona, amarillo d&c no. 10, benzoato de denatonio, éter monoetilico de dietilenglicol, diisopropanolamina, adipato de diisopropilo, dimeticona 100, laureth sulfosuccinato disódico, laurilsulfosuccinato disódico, docusato de sodio, edetato de disodio, ácido edético, fd&c verde no. 3, fd&c amarillo no. 6, glicerina, oleato de glicerilo, hexilenglicol, polietileno de alta densidad, hialuronato de sodio, ácido clorhídrico, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hipromelosa, alcohol isopropílico, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, ácido isoesteárico, ácido láctico, laureth-4, aceite de lavanda, lecitina, aceite de limón, mineral ligero aceite, limoneno, manitol, triglicéridos de cadena media, mentol, laurato de metilo, salicilato de metilo, metilparabeno, cera microcristalina, aceite mineral, niacinamida, octoxinol-9, octildodecanol, alcohol oleílico, parfum creme 45/3, PEG/ppg-18/18 dimeticona, aceite de ricino hidrogenado PEG-60, éter metílico de peg-7, pentadecalactona, phenonip, fenoxietanol, ácido fosfórico, poloxámero, policarbofilo, polietilenglicol, polioxil 20 cetosteáril éter, polipropilenglicol, polisorbato, hidróxido de potasio, ppg-15 estearil éter, diestearato de éter de metilglucosa ppg-20, galato de propilo, propilenglicol, monolaurato de propilenglicol, propilparabeno, ácido ricinoleico, sacarina de sodio, sd alcohol 40-2, sepineo p 600, dióxido de silicio, benzoato de sodio, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, lactato de sodio, lauril sulfato de sodio, fosfato de sodio, ácido sórbico, monolaurato de sorbitán, ácido succínico, alcohol terc-butílico, dióxido de titanio, citrato trisódico dihidrato, trolamina, trometamina, tiloxapol, goma xantana, etanol, hidroxitolueno butilado, copolímero de carbómero tipo c (alil pentaeritritol reticulado), homopolímero de carbómero tipo c (alil pentaeritritol reticulado), miristato de isopropilo, ácido oleico, propilenglicol, e hidróxido de sodio.

Las pastillas para la garganta son composiciones farmacéuticas diseñadas para disolverse en la cavidad bucal, habitualmente por administración sublingual o bucal. Preferiblemente, el extracto de fenogreco se administra junto con bentonita para potenciar el efecto farmacéutico.

Los aditivos farmacéuticos aceptables para la pastilla para la garganta pueden incluir una o más de las siguientes sustancias: acacia, acesulfamo de potasio, ácido cítrico, aspartamo, policarbofil de calcio, monohidrato de ácido cítrico, dextratos, dextrosa, sabor a canela, falvor de menta, hidroxipropilcelulosa, estearato de magnesio, maltodextrina, manitol, salicilato de metilo, aceite de menta, bicarbonato de potasio, povidona K30, dióxido de silicio, alginato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, fosfato de sodio, estearil fumarato de sodio, almidón pregelatinizado, sorbitol, sucralosa, sacarosa, talco, goma de xantano.

Preferentemente, cuando la bentonita está presente en la composición, la mezcla del extracto de *Trigonella foenum-graecum* y la bentonita está presente en la misma composición. Alternativamente, pueden suministrarse en un kit de partes, es decir, una parte comprende el extracto de *Trigonella foenum-graecum* y la otra parte comprende la bentonita.

La solución para rociar se administra como un aerosol (o niebla) en el área relevante del cuerpo. La pulverización puede realizarse mediante un denominado nebulizador comúnmente utilizado en el tratamiento de enfermedades o trastornos respiratorios. Los nebulizadores utilizan oxígeno, aire comprimido o energía ultrasónica para descomponer las soluciones y suspensiones en pequeñas gotas de aerosol que se inhalan desde la boquilla del dispositivo. Un ejemplo de un nebulizador útil es el nebulizador Philips InnoSpire Essence y el inhalador Beurer.

La pulverización también puede realizarse mediante un inhalador, tal como un inhalador de dosis medida (MDI), un inhalador de polvo seco o un inhalador de niebla suave. Los inhaladores están diseñados para administrar medicamentos directamente a los pulmones a través de la propia respiración de una persona. Esto puede beneficiar a un paciente al proporcionar el extracto directamente a las áreas de la enfermedad, permitiendo que la medicación tenga un mayor efecto sobre su objetivo previsto y limitando los efectos secundarios de los medicamentos debido al tratamiento localizado. Los aerosoles generalmente están por debajo de un tamaño de 6 micrómetros para permitir que se administren a los alvéolos.

Los aerosoles nasales incluyen una composición farmacéutica líquida, que se insufla a través de la nariz. Los dispositivos adecuados son bombas mecánicas de pulverización de líquido e inhaladores de dosis medidas (pMDI) presurizados para uso nasal. Puede desearse limitar la fracción de partículas respirables por debajo de 9 µm para evitar la inhalación pulmonar de la composición farmacéutica.

Los varios aspectos e implementaciones se han descrito junto con diversas realizaciones en la presente. Sin embargo, los expertos en la técnica pueden entender y efectuar otras variaciones a las realizaciones descritas al practicar la materia reivindicada, a partir de un estudio de los dibujos, la descripción y las reivindicaciones adjuntas. En las reivindicaciones, la palabra "que comprende" no excluye otros elementos o pasos, y el artículo indefinido "un" o "una" no excluye una pluralidad.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1**

Preparación de un aerosol para administración oral Se prepara una solución acuosa del polvo de fenogreco proporcionando 1962g de agua medida en un vaso de precipitados. Durante la agitación suave, se agregaron 20,0g de Versatil PC obtenido de Evonik Dr. Straetmans GmbH junto con 5,00g de extracto de fenogreco en el ejemplo 3.

La solución acuosa se administró a pacientes con Covid-19 mediante un nebulizador Philips InnoSpire Essence.

**Ejemplo 2**

Preparación de pastillas para la garganta

Se agregaron los siguientes componentes a un recipiente durante la agitación para obtener una mezcla en polvo:

Fenogreco en polvo	12,0 kg
Bentonita	6,0 kg
Mentol	1,33 kg
Gel de sílice micronizado *)	4,00 kg
Menta	9,50 kg
Estearato de magnesio	11,00 kg
Sorbitol (granular)	1.000 kg

\*) Siloide AL-1

La mezcla de potencia se transportó a una prensa de comprimidos y se obtuvieron comprimidos con un peso promedio de 1044 mg.

**Ejemplo 3**

Preparación de fenogreco en polvo

La preparación de un extracto en polvo de semillas de *Trigonella foenum-graecum* (fenogreco) se realizó de la siguiente manera: Se remojaron 500 g de semillas de *Trigonella foenum-graecum* en 2,5 l de agua durante aproximadamente 24 horas. Después del remojo previo, las semillas se cocinaron durante 20 minutos y los restos de las semillas se retiraron de la mezcla.

El extracto acuoso se secó por pulverización para obtener un polvo de acuerdo con ISO9001:2008. El extracto acuoso tenía un contenido de materia seca de 1,2-2,0 % en peso y una temperatura de 5 ° C. En un calentador de concentrado, el extracto se calentó a una temperatura de 62 ° C antes de la pulverización mediante un atomizador centrífugo (GEA Niro) que funciona a 12.500 rpm. La temperatura de entrada del secador fue de 170 ° C y la temperatura de salida del secador fue de 87 ° C. El polvo secado por pulverización se secó posteriormente en un lecho fluido a una temperatura de 24 ° C. El contenido de humedad en polvo del producto seco fue de 3,58% en peso y el tamaño de las partículas estuvo principalmente en el intervalo de 5-30 µm.

Debido a la baja materia seca del extracto de alimentación, la densidad aparente del polvo fue baja, es decir, en el intervalo de 0,08 a 0,1 kg/l. Un mayor contenido de materia seca de, por ejemplo, 15 % en peso podría haber producido una mayor densidad aparente y partículas más grandes.

Se observó que durante el secado por pulverización se evaporó una cantidad importante del sotonol presente en el

extracto acuoso, lo que produjo un producto secado por pulverización con menos sabor desagradable a sotolon.

#### Ejemplo 4

##### 5 Aislamiento viral y condiciones de crecimiento

10 Todo el trabajo con SARS-CoV-2 viable se realizó en un laboratorio BSL-3 aprobado. Se recuperaron aislados de cepas ancestrales de SARS-CoV-2 (en lo sucesivo denominadas cepas de tipo silvestre) y variantes (Tabla 2) de muestras de hisopo orofaríngeo de pacientes y se propagaron. Se agregaron 500  $\mu$ L de muestra faríngea suspendida con 4.5 mL de DMEM precalentado a 37 ° C con GlutaMAX, 2% de HI FBS, 1% de PS y 1% de anfotericina B (en lo sucesivo, infección DMEM (iDMEM)) a células Vero E6 sembradas 24 h antes y cultivadas hasta confluencia en matraces de cultivo T75. Los matraces de cultivo se incubaron durante 1 h en una mesa oscilante seguido de la adición de 15 mL adicionales de iDMEM. Los matraces de cultivo se incubaron durante tres a cinco días o hasta que apareció un efecto citopático (CPE) distinto y todas las células se separaron del matraz. Se aspiró todo el contenido de los matraces de cultivo, se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 mL y se centrifugó 5 min. a 450  $\times$  g para depurar los desechos celulares de la solución concentrada. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y desde aquí se dividió en alícuotas en porciones de 500  $\mu$ L y se almacenó a -80 ° C. Además, 200  $\mu$ L de sobrenadante se diluyeron 10<sup>3</sup> veces en iDMEM y se sometieron a RT-PCR en tiempo real por duplicado.

20 Tabla 1 - Virus utilizados en los experimentos a lo largo de la tesis. El asterisco (\*) implica que la cepa se aisló de muestras de hisopado orofaríngeo del paciente.

Tabla 1

Nombre	Cepa	Referencia
Tipo silvestre	SARS-CoV-2 (cepa ancestral)	Este estudio*
Alfa	Variante del grupo B.1.1.7 del SARS-CoV-2	Este estudio*
Beta	variante del grupo B.1.351 del SARS.CoV-2	Este estudio*
Delta	Variante del grupo B.1.617.2 del SARS-CoV-2	Este estudio*
Mink	Variante del grupo N439K/Y453F del SARS-CoV-2	Este estudio*
Ómicron	Variante del grupo B.1.1.529 del SARS-CoV-2	Este estudio*

##### 25 Ensayo en placa

30 La cuantificación del SARS-CoV-2 viable se realizó en ensayos de placas de alta sensibilidad utilizando células Vero E6. Se sembraron aproximadamente 1 $\times$ 10<sup>6</sup> células Vero E6 por pocillo en placas de microtitulación de 6 pocillos y se incubaron durante la noche para permitir el establecimiento de una monocapa confluyente de acuerdo con la sección 3.1. Después de casi 24 h, la monocapa de células Vero E6 estaba lista para la infección con muestras que contenían SARS-CoV-2.

35 Antes de la infección, se prepararon muestras que contenían virus y se diluyeron, si era necesario, en iDMEM, asegurándose de que fuera posible contar las unidades formadoras de placa (UFP) en una de las diluciones. La preparación de las varias muestras del SARS-CoV-2 se explica en secciones separadas. Si se utiliza una solución concentrada de SARS-CoV-2 o muestras que contienen virus almacenadas a -80 ° C, las muestras se descongelaron en un baño de agua a 37 ° C antes de su uso.

40 Se retiró cDMEM de las células Vero E6 y se colocaron 300  $\mu$ L de suspensión de virus en la capa celular. La placa de microtitulación de 6 pocillos se incubó durante 1h en una mesa oscilante para evitar que las células se sequen. Mientras tanto, se preparó el medio de recubrimiento. Se calentó DMEM con GlutaMAX, HI FBS al 3%, PS al 1% y anfotericina B al 1% (en lo sucesivo, gel DMEM (gDMEM)) a 48 °C en un baño de agua. Se licuó agarosa al 3% en DMEM con GlutaMAX en el horno de microondas durante 1-2min. Se mezcló una parte de agarosa al 3% licuada con tres partes de gDMEM a 48 °C. A menos que se especifique lo contrario, la solución de infección permaneció en los pocillos cuando se aplicó la capa de gel. Se colocaron suavemente 3mL de recubrimiento de gel sobre las células Vero E6 infectadas y se dejaron enfriar durante aproximadamente 5min antes de incubar la placa de microtitulación durante 48-52h, a menos que se especifique lo contrario. 800  $\mu$ L de solución de formalina amortiguada neutra al 10% (formaldehído) (Sigma-Aldrich Cat. No. HT5011) se colocó en el recubrimiento de gel para fijar la capa de células infectadas durante al menos 1 h y un máximo de 24 h. Posteriormente, se aspiró y descartó el exceso de formaldehído, y se retiró suavemente el recubrimiento de gel utilizando un elevador de células. 1mL de solución de cristal violeta de Gram al 10% (Sigma-Aldrich Cat. No. 94448) a las células fijadas y se dejaron durante 2min antes de que las células se enjuagaran con 3mL de solución salina al 0.9% y se dejaron secar. Se examinó la placa de microtitulación con capas de células teñidas, se fotografió y se contaron las UFP como se muestra en la Figura 1, que es una ilustración del método de ensayo de placa de alta sensibilidad. Con base en el valor Cq de las muestras que contienen SARS-CoV-2, se diluyeron a una concentración adecuada. Se retiró cDMEM de las placas de 6 pocillos y se agregaron 300

pL de muestra a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1h en una mesa oscilante. Se aplicaron 3mL de recubrimiento de gel a cada pocillo y las placas se incubaron durante 48-50h antes de la fijación con 800pL de formaldehído durante 1h. Después, se retiró el exceso de formaldehído junto con el recubrimiento de gel. La capa de células infectadas se tiñó con 1mL de violeta cristal durante 10min, seguido de enjuague con 3mL de solución salina al 0,9% y examen.

### Ejemplo 5

#### Inactivación del virus SARS Covid-19

El polvo de extracto de fenogreco utilizado se extrajo específicamente de semillas de plantas de fenogreco de acuerdo con un método patentado por Jens Steen Olsen en la patente DK2155222T3. La extracción se realizó en otro lugar y fue proporcionada por QUR Medical ApS. La disolución del fenogreco siempre tuvo lugar aproximadamente 24 horas antes del experimento y se almacenó a 4 ° C a menos que se indique lo contrario.

Se disolvió polvo de extracto de fenogreco en iDMEM a una concentración de 13,33 mg/mL. La solución concentrada de tipo silvestre de SARS-CoV-2 con una concentración de  $2 \times 10^6$  PFU/mL se mezcló 1:9 con extracto de fenogreco disuelto y se incubó. En los momentos 10, 20, 30 y 40min después de la incubación, se aspiraron 100µL de suspensión de virus y se diluyeron en iDMEM precalentado a 37°C a una concentración de 200 PFU/mL. Se agregaron 300µL de muestra diluida a la capa de células Vero E6 en placas de microtitulación de 6 pocillos por duplicado. Las placas de microtitulación se incubaron durante 1 h antes de aplicar un recubrimiento de gel, se incubaron durante 48-50h, se fijaron y se tiñeron como se describe en el Ejemplo 4. Se estableció un control positivo con virus y fenogreco, un control negativo con fenogreco y sin virus, y un control negativo sin fenogreco y virus en el tiempo 0 después de la incubación junto con el experimento. La Figura 2 ilustra los resultados del ensayo de placa duplicado, en donde el control positivo se diluye  $10^5$  veces (A1), el control positivo se diluye  $10^4$  veces (A2), el SARS-CoV-2 se trata con fenogreco durante 10min. (B), el SARS-CoV-2 se trata con fenogreco durante 20min. (C), el SARS-CoV-2 se trata con fenogreco durante 30min. (D), el SARS-CoV-2 se trata con fenogreco durante 40 min. (E), control negativo sin fenogreco o virus (F1), y control negativo con fenogreco y sin virus (F2). Las puntas de flecha blancas muestran daño en la capa de células causado por el levantador de células al retirar el recubrimiento de gel, y no son placas.

En un segundo ejemplo de inactivación del virus SARS Covid-19, el polvo de acuerdo con el ejemplo 3 se usó en una solución acuosa al 0,25% en un estudio de unidad formadora de placa (PFU). El estudio se utiliza para describir el número de partículas de virus capaces de formar placas por unidad de volumen después del tratamiento con la solución acuosa durante un tiempo determinado.

Los números de unidades formadoras de placa se miden en mezclas de reacción in vitro mediante métodos estándar (Methods Enzymol. 1981;78(Pt A):315-25. Autores. R R Rueckert, M A Pallansch). Más específicamente, el polvo de extracto se disolvió al 2,5% en DMEM + 2% de FBS el mismo día del experimento. Se agregaron 100µl de solución concentrada de virus (concentración  $2 \times 10^6$  PFU/mL) a la solución en polvo y se mezclaron. Cada 10 minutos durante 40 minutos, se extrajeron 100µl de suspensión de virus y se diluyeron  $10^4$  veces en DMEM + FBS al 2%. Se agregaron 300µl de la solución de virus diluida a las células Vero E6 y se cultivaron en un ensayo de placa. En paralelo, se realizaron ensayos de placa de control en los que la solución en polvo sin virus se prueba con las células Vero E6. El ensayo de control no mostró efectos tóxicos en las células VERO E3.

Después del cultivo, se estima el número de partículas de virus sobrevivientes. Los resultados se muestran en la Figura 18.

La Figura 18 muestra que la cantidad de PFU disminuye drásticamente cuando se trata durante 10 minutos con la solución acuosa al 0,25%. Después del tratamiento durante 40 minutos, la capacidad del virus SARS-CoV-2 para formar PFU se redujo en un 99,6%.

### Ejemplo 6

#### Prueba de extracto de fenogreco centrifugado

Se disolvió polvo de extracto de fenogreco en iDMEM a una concentración de 13,33 mg/mL. A partir de la solución de fenogreco, una porción se centrifugó a 2,000 xg durante 10 min. El sobrenadante se aspiró a un nuevo tubo y el sedimento se descartó. La solución concentrada de tipo silvestre de SARS-CoV-2 con una concentración de  $3,5 \times 10^5$  PFU/mL se mezcló 1:9 con solución de fenogreco y solución de sobrenadante de fenogreco y se incubó durante 30 min. Después de la incubación, las mezclas de tratamiento se diluyeron  $10^2$  veces en iDMEM precalentado a 37°C y se agregaron 300pL a la capa de células Vero E6 en placas de microtitulación de 6 pocillos en cuatro réplicas. Las placas de microtitulación se incubaron durante 1 h antes de aplicar el recubrimiento de gel, incubar, fijar y teñir como se describe en el Ejemplo 4. La Figura 3 ilustra los resultados del ensayo de placa de las cuatro réplicas en las que el control positivo se diluye  $10^3$  veces (A), el SARS-CoV-2 se trata con solución sobrenadante de fenogreco después de la centrifugación (B) y el SARS-CoV-2 se trata con fenogreco para (C).

**Ejemplo 7**

Pastillas de prueba que contienen extracto de fenogreco

- 5 Tanto las pastillas con extracto de fenogreco (pastilla activa) como las pastillas sin fenogreco (pastilla de placebo) fueron hechas y proporcionadas por QUR Medical ApS. La composición de cada pastilla se enumera en la Tabla 2.

Tabla 2

Ingrediente	Especificación	Pastilla activa mg/pastilla	Pastilla de placebo mg/pastilla
Extracto de fenogreco en polvo	Jens Olsen	24,00	0,00
Mentol	T3764	1,33	1,33
Menta	T4603	9,50	9,50
Siloiide AL-1	E 551	4,00	4,00
Estearato de magnesio, vegetal.	E 470b	11,00	11,00
Granulado de sorbitol	E 420i	1000,00	1000,00

10 Se disolvió una pastilla en 1 mL de iDMEM. Se mezclaron 200µL de iDMEM con pastilla disuelta con 200µL de solución concentrada de tipo silvestre de SARS-CoV-2 con una concentración de  $8 \times 10^6$  PFU/mL. De esta manera, la mezcla de tratamiento tenía una concentración de fenogreco de 12mg de fenogreco en polvo por mL. La mezcla de tratamiento se incubó durante 30min. Después de la incubación, la mezcla de tratamiento se diluyó  $5 \times 10^2$  veces en iDMEM precalentado a 37 °C y se agregaron 300 µL a la capa de células Vero E6 en placas de microtitulación de 6 pocillos. Las placas de microtitulación se incubaron durante 1h antes de aplicar el recubrimiento de gel, incubar, fijar y teñir como se describe en el Ejemplo 4. La Figura 4 ilustra uno de cada triplicado de cada concentración de fenogreco en el ensayo de placa, en donde las unidades formadoras de placa (PFU) de SARS-CoV-2 se tratan in vitro con las pastillas activas y placebo. A-C ilustra el efecto de la solución activa de pastillas con una concentración de 12, 1,5 y 0,75 mg/mL de fenogreco, respectivamente. D-F ilustra la pastilla de placebo sin fenogreco diluida 0, 8 y 16 veces, correspondiente a las diluciones en A, B y C, respectivamente. Las PFU se contaron a partir del ensayo de placa y se ilustran en la Figura 5, en donde (A) es una gráfica que ilustra la supervivencia del SARS-CoV-2 a diferentes concentraciones de tratamiento con fenogreco. Se visualizan las pastillas activas comparadas con las pastillas de placebo diluidas 0, 8 y 16 veces, respectivamente. (B) Muestra una disminución significativa en la supervivencia del SARS-CoV-2 al probar la pastilla activa contra el SARS-CoV-2 (x0:  $p=0,0023$ , x8:  $p=0,0049$  y x16  $p=0,0277$ ). Los resultados se analizaron mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Sidak. Los datos se presentan como media  $\pm$  SD.

30 En un segundo ejemplo de inactivación del virus SARS Covid-19 usando pastillas, se preparó una solución concentrada disolviendo 209 mg de los comprimidos producidos en el ejemplo 2 en 400 mL de agua. La solución concentrada se diluyó 2 veces, 4 veces, 8 veces, 16 veces y  $10^5$  veces. La solución concentrada y las diluciones se probaron en virus SARS COVID-19 y placebo. Los resultados se indican en la siguiente tabla.

Tabla 3:

Activo			Placebo		
Dilución	PFU/300µL	PFU/mL	Dilución	PFU/300µL	PFU/mL
No diluido	2	399600	No diluido	20	3996000
x2	3	599400	x2	27	5394600
x4	5	999000	x4	23	4595400
x8	12	2397600	x8	22	4395600
x16	10	1998000	x16	19	3796200
Solución concentrada $10^5$	14	4662000	Solución concentrada $10^5$	14	4662000

35 La tabla muestra que está presente una infectividad dependiente de la respuesta a la dosis a medida que el número de PFU disminuye cuando aumenta la concentración del extracto de fenogreco. Las pruebas de placebo o de control no muestran la misma dependencia dosis-respuesta.

**Ejemplo 8**

Prueba de viabilidad de células Vero E6

## 5 Línea celular humana y condiciones de crecimiento

Las células Vero E6 (clones de células de riñón de mono verde africano) (ATCC® CRL-1586™) se mantuvieron en matraces de cultivo de células T75 (Thermo Scientific™ Cat. No. 156499) con medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con GlutaMAX, suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (HI FBS) y penicilina-estreptomicina (PS) al 1% (10.000 unidades/mL de penicilina, 10.000 ug/mL de estreptomicina) (Gibco<sup>MR</sup> Cat. No. 15140122) (en adelante DMEM completo (cDMEM)). Las células siempre se incubaron en una atmósfera humidificada a 37°C que contenía CO<sub>2</sub> al 5%, a menos que se indique lo contrario. Para los experimentos, las células Vero E6 se sembraron 24 h antes de formar una monocapa en placas de 6 pocillos (Thermo Scientific™ Cat. No. 140675) o en matraces de cultivo T25 (Thermo Scientific™ Cat. No. 156367). cDMEM siempre se aspiró antes del uso de placas de 6 pocillos y matraces de cultivo T25.

Antes de la división celular, las células Vero E6 se lavaron tres veces con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) estéril antes del tratamiento con 5mL de tripsina durante 5min, para romper la unión de las células Vero E6 a la superficie del matraz de cultivo. Se agregaron 5mL de cDMEM al matraz de cultivo celular para detener el efecto de la tripsina. Las células se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 mL y se centrifugaron durante 2min. a 200 × g. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 6mL de cDMEM. Para las placas de 6 pocillos, se sembraron 1 mL de células resuspendidas en cada uno de los 6 pocillos y se incubaron durante la noche (ON) para formar una monocapa. Para los matraces de cultivo T25, se sembraron 2 mL de células resuspendidas en un matraz de cultivo T25 con 3mL de cDMEM adicional y se incubaron para formar una monocapa.

Las capas de células Vero E6 en una placa de 24 pocillos se trataron con fenogreco a diferentes concentraciones para evaluar los posibles efectos citotóxicos. El polvo de extracto de fenogreco se disolvió en iDMEM a una concentración de 12 mg/mL, a partir de la cual se realizó una fila de dilución. Las diluciones de fenogreco que varían de 1 mg/mL a 12 mg/mL con un intervalo de 0,5 mg/mL se analizaron en la placa de 24 pocillos. Cada día durante cuatro días, las capas de células se inspeccionaron manualmente utilizando un microscopio de campo claro y se tomaron fotografías al cuarto día después de que los pocillos se lavaron tres veces con PBS. La Figura 6 muestra imágenes representativas capturadas en el cuarto día. Las imágenes de la Figura 6 muestran un extracto de las imágenes de microscopio de campo claro de las capas de células Vero E6 tratadas con diferentes concentraciones de fenogreco en el cuarto día. La concentración mínima mostrada es de 2 mg/mL, ya que las concentraciones más bajas no mostraron efectos en la capa de células. La concentración máxima mostrada es de 10 mg/mL, ya que las capas de células tratadas con concentraciones más altas mostraron un efecto citopático. Por lo tanto, la interpretación no se basa únicamente en lo que se muestra.

**Ejemplo 9**

40 Determinación de la concentración inhibitoria del 50 % para la solución concentrada de fenogreco de tipo silvestre del SARS-CoV-2 con una concentración de  $4 \times 10^5$  PFU/mL se mezcló 1:9 con fenogreco disuelto en iDMEM, obteniéndose concentraciones finales de fenogreco de 12, 6, 3, 1,5, 0,75, 0,375, 0,188, 0,0938, 0,0469 y 0,0234 mg/mL, respectivamente, y se incubó durante 30 min. Las muestras de virus tratadas se diluyeron  $10^2$  veces en iDMEM precalentado a 37 °C. Se colocaron 300 µL en células Vero E6 en placas de 6 pocillos por triplicado y se incubaron durante 1 h en una mesa oscilante, antes de aplicar el recubrimiento de gel a cada pocillo. Los pocillos se fijaron, se tñieron como se describe en el Ejemplo 4. Se produjeron triplicados de cada concentración en el ensayo de placas (Figura 7), en donde las células Vero E6 se infectan con SARS-CoV-2 tratado con fenogreco. Se realizaron diferentes concentraciones de extracto de fenogreco utilizado para el tratamiento por triplicado. Las concentraciones de fenogreco utilizadas para tratar el SARS-CoV-2 durante 30 min. fueron: (A)=12 mg/mL, (B)=6 mg/mL, (C)=3 mg/mL, (D)=1,5 mg/mL, (E)=0,75 mg/mL, (F)=0,375 mg/mL, (G)=0,1875 mg/mL, (H)= 0,09375 mg/mL, (I)= 0,046875 mg/mL, (J)= 0,0234375 mg/mL, (K)= control positivo sin fenogreco, (L)= control negativo sin SARS-CoV-2 y fenogreco.

55 Los valores medios de las PFU contadas de la Figura 7 se muestran como una presentación gráfica en la Figura 8. La línea roja y el asterisco indican la mitad de las PFU/mL para el control. La intersección con el gráfico y la línea roja indica la concentración teórica de fenogreco, que inhibiría el SARS-CoV-2 en un 50%. El experimento se realizó dos veces, con diluciones adicionales entre 0,75 y 0,375 mg/mL la segunda vez, Figura 9.

60 **Ejemplo 10**

Modo de unión de fenogreco

65 Se realizaron tres experimentos simultáneos en matraces de cultivo T25 con capas de células Vero E6 confluentes, uno que sirve como control, uno con células tratadas con fenogreco y uno con virus tratado con fenogreco.

Para la configuración del control positivo (Figura 10A), la solución concentrada de tipo silvestre de SARS-CoV-2 con una concentración de  $4 \times 10^5$  PFU/mL se diluyó  $10^4$  veces en iDMEM precalentado a  $37^\circ\text{C}$ , lo que produjo una concentración de aproximadamente 40 PFU/mL. Se agregaron 700pL de SARS-CoV-2 diluido a la capa de células Vero E6, se incubaron durante 1h en una mesa oscilante, seguido de la adición de 10mL de iDMEM precalentado a  $37^\circ\text{C}$  adicional. Los matraces de cultivo se incubaron durante 6 días.

Para los matraces de cultivo con una capa de células tratadas con fenogreco (Figura 10B), se disolvió fenogreco en polvo en iDMEM para alcanzar una concentración de 12 mg/mL aproximadamente 24h después del experimento. Se agregaron 700uL de fenogreco disuelto a la capa de células Vero E6 y se incubaron durante 30min en una mesa oscilante. Después de la incubación, la capa de células se lavó cinco veces con iDMEM precalentado a  $37^\circ\text{C}$ , seguido de la adición de 700pL de SARS-CoV-2 de tipo silvestre diluido  $10^4$  veces (como se describe para el control positivo) y la incubación durante 1h en una mesa oscilante. A continuación, se agregaron 10mL de iDMEM precalentado a  $37^\circ\text{C}$  adicional a los matraces de cultivo y se incubaron durante 6 días.

Para el matraz de cultivo donde la capa de células debe infectarse con SARS-CoV-2 tratado con fenogreco (Figura 10C), el extracto de fenogreco en polvo se disolvió en iDMEM para alcanzar una concentración de 13,33 mg/mL. La solución concentrada de tipo silvestre de SARS-CoV-2 con una concentración de  $4 \times 10^5$  PFU/mL se mezcló 1:9 con fenogreco disuelto, produciendo una concentración final de fenogreco de 12 mg/mL y se incubó durante 30min. Después de la incubación, la mezcla de tratamiento se diluyó  $10^3$  veces adicionales en iDMEM precalentado a  $37^\circ\text{C}$  y se agregaron 700pL a la capa de células Vero E6. Los matraces de cultivo se incubaron durante 1 h en una mesa oscilante, seguido de la adición de 10 mL de iDMEM precalentado a  $37^\circ\text{C}$  adicional. Los matraces de cultivo se incubaron durante 6 días. Para todos los matraces de cultivo, se aspiraron 650  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  antes de someterse a RT-PCR en tiempo real a las 0, 6, 22, 30, 45, 53, 69 y 144h después de la incubación (Figura 11). Además, se tomaron imágenes de las capas de células utilizando Moticam X (Motic<sup>®</sup>) en un microscopio de campo claro para observar el CPE (Figura 12).

### Ejemplo 10

Microscopía electrónica de infección por SARS-CoV-2 tratada con fenogreco Se realizó microscopía electrónica (EM) en dos tipos de capas de células Vero E6 infectadas con SARS-CoV-2 y se fijaron después de 1 y 16h de infección. Para la primera configuración, las células Vero E6 se sembraron en insertos de membrana en una placa de 6 pocillos 24h antes de la infección. La solución concentrada de tipo silvestre de SARS-CoV-2 con una concentración de  $5 \times 10^5$  PFU/mL se trató en una proporción 1:9 con 13,33 mg/mL de fenogreco disuelto en iDMEM durante 30 min. Se retiró cDMEM de los pocillos y se agregaron 3 mL de solución de SARS-CoV-2 tratada a cada pocillo, lo que resultó en una concentración final de  $5 \times 10^4$  PFU/mL y se incubó durante 1h en una mesa oscilante. Los pocillos se incubaron durante 1 y 16h adicionales, respectivamente, antes de vaciarse y fijarse con 1,5 mL de fijador de glutaraldehído (GA) al 2% durante 1h a temperatura ambiente (RT). Los insertos de membrana se lavaron con solución salina amortiguada con tris (TBS) antes de teñirse con tetróxido de osmio durante 1h. Después, los insertos de membrana teñidos se lavaron tres veces con PBS y se cortaron del inserto antes de que la membrana se enrollara alrededor de sí misma y se incrustara en una cápsula de gelatina lista para EM.

Para la segunda configuración, la solución concentrada de tipo silvestre de SARS-CoV-2 con una concentración de  $5 \times 10^5$  PFU/mL se trató en una proporción 1:9 con 13,33 mg/mL de fenogreco disuelto en iDMEM durante 30min. Las células Vero E6 en matraces de cultivo T25 se infectaron con 5 mL de solución concentrada de SARS-CoV-2 tratada con fenogreco y se incubaron durante 1 h en una mesa oscilante. Los matraces de cultivo se incubaron durante 1 y 16h adicionales, respectivamente, antes de aspirar el contenido, lavar las capas de células infectadas con PBS trice y agregar 1mL de fijador de GA al 2%. Los matraces de cultivo se incubaron durante 1h a TA. Posteriormente, la capa de células se raspó usando un elevador de células y todo el contenido de los matraces de cultivo se aspiró en un tubo de centrifuga, se centrifugó a  $200 \times g$  durante 2min y se retiró el sobrenadante. Se agregaron 5mL de albúmina de suero bovino al 15% disuelto en TBS al sedimento celular, se mezclaron suavemente y se incubaron durante 30 min. a TA. Después, las células resuspendidas se centrifugan a  $1.000 \times g$  durante 5min. El sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se recubrió cuidadosamente con fijador de GA al 2% en PBS y se incubó durante la noche a  $4^\circ\text{C}$ . Los gránulos solidificados se recuperaron y procesaron para su incrustación en epon antes de EM.

Para las infecciones fijadas 1h p.i., solo fue posible identificar algunas partículas de virus SARS-CoV-2 utilizando EM. En la Figura 13A-B se muestran capas de células cultivadas en matraces de cultivo e infectadas con SARS-CoV-2 y SARS-CoV-2 tratado con fenogreco, respectivamente. La Figura 13C-D muestra las capas de células cultivadas en insertos de membrana e infectadas con SARS-CoV-2 y SARS-CoV-2 tratado con fenogreco, respectivamente. Las puntas de flecha negras indican partículas de SARS-CoV-2 que infectan las células Vero E6.

Las infecciones realizadas en insertos de membrana y fijadas 16h p.i. se muestran en la Figura 14. En las imágenes del control positivo (Figura 14A-B), las puntas de flecha negras indican algunas de las partículas numéricas de SARS-CoV-2, ya sea intracelular, extracelular o unidas a la membrana celular. Las células Vero E6 en insertos de membrana tratados con fenogreco (Figura 14C-D) no mostraron signos de partículas de SARS-CoV-2.

En la Figura 15 se visualizan las infecciones realizadas en matraces de cultivo y fijadas 16h p.i. En las imágenes del

control positivo (Figura 15A-B), las puntas de flecha negras muestran algunos de los números de SARS-CoV-2, ya sea intracelular o unido a la membrana celular. Las células Vero E6 tratadas con fenogreco (Figura 15C-E) no mostraron signos de SARS-CoV-2. Sin embargo, las puntas de flecha blancas en la Figura 15E, que es una imagen de primer plano de la Figura 15D, muestran posibles partículas de SARS-CoV-2. Sin embargo, la imagen de primer plano no proporciona más confirmación de si se trata de partículas de virus.

### Ejemplo 11

Aplicación de fenogreco a la capa de células infectadas

El extracto de fenogreco se disolvió en iDMEM a una concentración de 60 mg/mL. Las células Vero E6 cultivadas en una capa de células confluentes en 12 matraces de cultivo T25 se infectaron con 700  $\mu$ L de solución concentrada de tipo silvestre de SARS-CoV-2 diluida  $10^4$  veces y se incubaron durante 1h en una mesa oscilante. Después, tres matraces (denominados control) se llenaron con 5mL de iDMEM, tres matraces (denominados T0) se llenaron con 4 mL de iDMEM y 1 mL de solución de fenogreco de 60 mg/mL, lo que produjo una concentración de fenogreco de 12 mg/mL. Los seis matraces de cultivo restantes (tres denominados T20 y tres denominados T26, respectivamente) se llenaron con 4mL de iDMEM. Se aspiraron 650  $\mu$ L de sobrenadante de todos los matraces de cultivo y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , lo que indica el punto de partida de la infección para todos los matraces de cultivo. Se agregaron 650  $\mu$ L adicionales de iDMEM a los matraces de cultivo T20 y T26 y todos los matraces de cultivo se incubaron durante 20h. 20h después de la infección (p.i.) Se agregó 1mL de solución de fenogreco de 60 mg/mL a los matraces de cultivo T20, lo que produjo una concentración de fenogreco de 12 mg/mL. Se aspiraron 650  $\mu$ L de sobrenadante de todos los matraces de cultivo y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se agregaron 650pL adicionales de iDMEM a los matraces de cultivo T26 y todos los matraces de cultivo se incubaron. 26 h p.i. Se agregó 1mL de solución de fenogreco de 60 mg/mL a los matraces de cultivo T26, lo que produjo una concentración de fenogreco de 12 mg/mL. Se aspiraron 650pL de sobrenadante de cada matraz de cultivo y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los matraces de cultivo se incubaron y a las 44 h y 68 h p.i., respectivamente, se aspiraron 650pL de sobrenadante de cada matraz de cultivo y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Después, todas las muestras se descongelaron a TA. Las muestras que contenían fenogreco se centrifugaron a  $450 \times g$  durante 5 min. y el sobrenadante se diluyó 2 veces en iDMEM. Todas las muestras se sometieron a RT-PCR y se evaluaron los valores de Cq.

En la Figura 16 se ilustran matraces de cultivo que sirven como controles positivos, matraces de cultivo a los que se agregó extracto de fenogreco inmediatamente después de la infección (T0), matraces de cultivo a los que se agregó extracto de fenogreco 20h p.i. (T20), y matraces de cultivo a los que se agregó extracto de fenogreco 26 h p.i., (T26).

### Ejemplo 11

Fenogreco contra variantes de SARS-CoV-2

El extracto de fenogreco se disolvió en iDMEM a una concentración de 13,33 mg/mL. Las variantes de SARS-CoV-2 y SARS-CoV-2 (ver Tabla 4 para las concentraciones de solución concentrada) se mezclaron 1:9 con fenogreco disuelto y se incubaron durante 30 min. Después, las muestras se diluyeron en iDMEM precalentado a  $37^{\circ}\text{C}$  para alcanzar el factor de dilución final enumerado en la Tabla 4. Las muestras tratadas con SARS-CoV-2 se analizaron en el ensayo de placas como se describe en la sección 3.3, con excepción del período de incubación antes de la fijación. Para cada cepa de SARS-CoV-2, el período de incubación antes de la fijación se enumera en la Tabla 4. En la Figura 17, la disminución en las variantes de SARS-CoV-2 o SARS-CoV-2 se ilustra en porcentaje.

Tabla 4

Nombre	Cepa SARS-CoV-2	Concentración de solución concentrada	Factor de dilución	Incubación
Tipo silvestre	SARS-CoV-2	$4 \times 10^5$ PFU/mL	1,000x	2 días
Alfa	Variante del grupo B.1.1.7	$8,21 \times 10^4$ PFU/mL	750x	3 días
Beta	Variante del grupo B.1.351	$5,58 \times 10^4$ PFU/mL	1,000x	3 días
Delta	Variante del grupo B.1.617.2	$7,1 \times 10^4$ PFU/mL	2,500x	3 días
Ómicron	Variante del grupo B.1.1.529	$1 \times 10^6$ PFU/mL	5,000x	3 días
Mink	Variante del grupo N439K/Y453F	$1,33 \times 10^5$ PFU/mL	2,500x	3 días

### Ejemplo 12

Análisis estadístico para los Ejemplos 1 - 11

El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism versión 9.1.2 (GraphPad Software, EUA). Los métodos

para evaluar la distribución normal fueron la prueba de Anderson-Darling, la prueba de D'Agostino y Pearson, la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Si se aprobó la prueba de normalidad, se realizó ANOVA unidireccional o bidireccional y la prueba de comparación múltiple de Šídák. Todos los datos se presentaron como media  $\pm$  desviación estándar (SD). Los valores de  $P < 0,05$  se consideran estadísticamente significativos y se indican como  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ ,  $p < 0,001 = ***$ ,  $p < 0,0001 = ****$ .

### Ejemplo 13

Estudio clínico exploratorio

Estrategia exploratoria

El estudio se basó en la prueba de pastillas con fenogreco producidas y proporcionadas por la empresa QUR Medical ApS. El objetivo del estudio fue investigar el efecto de las pastillas de fenogreco en voluntarios inmediatamente o a más tardar tres días después de dar positivo en la prueba de COVID-19. Se probaron las siguientes pastillas en el estudio: Pastilla activa que contiene 24 mg de extracto de fenogreco, pastilla activa que contiene 240 mg de extracto de fenogreco y una pastilla de placebo.

Se recogió una muestra de hisopo orofaríngeo, tomada por personal capacitado utilizando hisopos Universal Transport Medium<sup>MR</sup> (UTM), y una muestra de saliva (mín. 1 ml) tanto antes como después del consumo de las pastillas. Las pastillas debían tomarse individualmente y durante un período de tiempo de 20 minutos después de recolectar el hisopo orofaríngeo inicial y la muestra de saliva. Todas las muestras se almacenaron en un refrigerador una vez recolectadas y manejadas en bancos de flujo de aire laminar una vez en el laboratorio BSL-3.

Preparación de muestras de hisopo orofaríngeo y saliva

De las muestras de hisopo orofaríngeo, 650  $\mu$ L de muestra se sometieron a RT-PCR que sirvió como "valor Cq original". Las muestras de saliva se diluyeron 4 veces en UTM para hacer las muestras menos viscosas para RT-PCR y para el ensayo de placas. Se sometió una muestra de saliva diluida de 650  $\mu$ L a RT-PCR que sirvió como valor de Cq original. El material de muestra restante de las muestras orofaríngeas y de saliva se almacenó a  $-80^{\circ}$  C hasta su análisis posterior.

Análisis de muestras de hisopo orofaríngeo y saliva

Con base en el valor de Cq original, la muestra se diluyó de acuerdo con la Tabla 1 en medio Eagle modificado de Dulbecco precalentado a  $37^{\circ}$ C (DMEM) con GlutaMAX, suero bovino fetal inactivado por calor al 2% (HI FBS) y penicilina-estreptomocina (PS) al 1% (10,000 unidades/ml de penicilina, 10,000  $\mu$ g/ml de estreptomocina) (Gibco<sup>MR</sup> Cat. No. 15140122) (en adelante, iDMEM completo). Las muestras y sus diluciones asociadas estaban listas para el ensayo de placas.

Tabla 1 - Dilución de muestras de SARS-CoV-2 basadas en valores de Cq.

Valor Cq original	100	>29	25-28,99	<24,99
Dilución	Sin dilución	100 $\times$	1,000 $\times$	10,000 $\times$

Resultados

Un total de 57 voluntarios participaron en el estudio clínico exploratorio. El resultado del estudio involucra los mismos tipos de datos de dos grupos de prueba: 19 participantes que recibieron pastillas de fenogreco de 24 mg (grupo de prueba 1) y 38 participantes que recibieron pastillas de fenogreco de 240 mg (grupo de prueba 2). Cuatro participantes del grupo de prueba 1 recibieron pastillas de placebo además de pastillas activas. Los resultados de las pastillas de placebo no mostraron ningún efecto y, por lo tanto, los resultados específicos de las pastillas de placebo se excluyen del siguiente procesamiento de datos y resultados.

Entre los participantes del grupo de prueba 1, el 68,42% fueron vacunados con al menos 2 dosis. Los participantes completaron un cuestionario sobre los síntomas que habían experimentado durante la infección por SARS-CoV-2. No se pudo observar ninguna relación aparente entre el valor de Cq y el número o tipos de síntomas. No se realizó un seguimiento de los síntomas de los participantes después del tratamiento.

Para tener en cuenta la variación excesiva en los valores de Cq entre las muestras previas y posteriores, y para tener en cuenta las unidades formadoras de placas (PFU) inciertas contadas en los ensayos de placas, se aplicaron los siguientes criterios de exclusión:

- El valor de Cq no debe diferir más de 5 valores de Cq entre las muestras previas y posteriores al tratamiento

· Se debe contar un mínimo de 33,33 PFU/mL en el ensayo de placas.

A continuación, se muestran los resultados con y sin criterios de exclusión.

5 La Figura 19 muestra los resultados de las muestras de saliva antes y después del tratamiento con pastillas de fenogreco de 24 mg. Se excluyeron cuatro participantes debido a muestras de saliva negativas de RT-PCR de SARS-CoV-2 antes del tratamiento y, por lo tanto, el tamaño de la muestra de saliva fue de 15 participantes. Los valores medios de ARN de PFU/SARS-CoV-2 en muestras posteriores al tratamiento fueron 170 más bajos que en las muestras previas al tratamiento. Al aplicar los criterios de exclusión, se observó una reducción del 25% en los valores medios de ARN de PFU/SARS-CoV-2 en las muestras después del tratamiento en comparación con el pretratamiento.

De los 38 participantes en el grupo de prueba 2, solo se han analizado 27. Entre todos los participantes del grupo de prueba 2, 81,580 fueron vacunados con al menos 2 dosis. No se observó ninguna relación aparente entre el valor de Cq y el número o tipos de síntomas.

15 La Figura 20 muestra los resultados de las muestras de hisopo orofaríngeo antes y después del tratamiento con pastillas de fenogreco de 240 mg. Se excluyeron seis participantes debido a muestras negativas de hisopo de RT-PCR de SARS-CoV-2 antes del tratamiento y, por lo tanto, el tamaño de la muestra fue de 21 participantes. Se observó una reducción del 28% en los valores medios de ARN de PFU/SARS-CoV-2 en las muestras posteriores al tratamiento en comparación con las muestras tomadas antes del tratamiento. Si se aplican los criterios de exclusión, hubo una reducción del 27% en los valores medios de ARN de PFU/SARS-CoV-2 en muestras posteriores al tratamiento en comparación con las muestras tomadas antes del tratamiento.

25 La Figura 21 ilustra los resultados de la muestra de saliva antes y después del tratamiento. Se excluyeron cinco participantes debido a muestras de saliva negativas de RT-PCR de SARS-CoV-2 antes del tratamiento y, por lo tanto, el tamaño de la muestra fue de 20 participantes. Hubo una reducción del 73% en los valores medios de ARN de PFU/SARS-CoV-2 en muestras posteriores al tratamiento en comparación con el pretratamiento. Al aplicar los criterios, la reducción posterior al tratamiento en ARN de PFU/SARS-CoV-2 fue de 240.

30 Los ejemplos de resultados para personas individuales que prueban la pastilla de fenogreco de 240 mg se muestran en la Figura 22 A-B.

#### Ejemplo 14

35 Efecto anti-VHS y anti-VHS-I de extractos de plantas.

En la Figura 23, los extractos de semillas de plantas diluidos se incubaron durante 20 minutos con (A) HSV-2, (B) VIH-1, Influenza A (C), CMV (D), Adenovirus (E) o RSV (F) antes de agregar el virus a las células diana. La cuantificación del virus se realizó en el día 1-3 mediante ensayo de placa viral, ensayo indicador o inmunotinción. Datos representativos de cuatro (A), tres (B y C) y dos experimentos independientes (D-F), media + /- SD de duplicados.

#### Ejemplo 15

45 Análisis estadístico para los ejemplos 13 - 14

El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism versión 9.1.2 (GraphPad Software, EUA). Se realizaron pruebas de comparación múltiple de Šídák y ANOVA unidireccional. Todos los datos se presentaron como media ± desviación estándar (SD). Los valores de P <0,05 se consideran estadísticamente significativos y se indican como p<0,05 = \*, p<0,01 = \*\*, p<0,001 = \*\*\*, p<0,0001 = \*\*\*\*.

50

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para usarse en un método para el tratamiento de una enfermedad inducida por virus, en donde la composición comprende un extracto de *Trigonella foenum-graecum* y opcionalmente aditivos farmacéuticamente aceptables, donde el método comprende la administración de entre 20 mg y 250 mg de extracto de *Trigonella foenum-graecum* al menos una vez al día.
- 10 2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el virus es un virus envuelto, Coronavirus, un Simplexvirus, un Citomegalovirus, un Orthomixovirus y/o un Retrovirus.
- 15 3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, donde el virus es un Coronavirus relacionado con el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARSr-CoV), tal como SARS-CoV-1 o SARS-CoV-2, un Virus del Herpes Simple 1 o 2, un Betaherpesvirus Humano 5 (HCMV, citomegalovirus humano, HHV-5), un virus de la Influenza A, B, C o D y/o un Virus de Inmunodeficiencia Humana 1 o 2 (VIH-1, VIH-2).
- 20 4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, donde este virus SARSr-CoV es un tipo silvestre de SARS-CoV-2 o una variante de linaje genético Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2), Mink (Grupo N439K/Y453F) y/u Ómicron (B.1.1.529), Épsilon (B.1.427/B.1.429), Zeta (P.2), Eta (B.1.525), Theta (P.3), Iota (B.1.526), Kappa (B.1.617.1), Lambda (C.37) o Mu (B.1.621).
- 25 5. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad es COVID-19, herpes labial, herpes genital, mononucleosis, neumonía, influenza (gripe) y/o síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).
- 30 6. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde esta composición farmacéutica se formula como una solución para rociar, como un medicamento tópico, como una pastilla para la garganta o como un comprimido.
- 35 7. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además bentonita.
- 40 8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, donde la bentonita comprende 50% en peso o más de esmectita.
- 45 9. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, que comprende 1:10 a 10:1 en peso de materia seca de extracto de *Trigonella foenum-graecum* a bentonita.
- 50 10. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde se inicia un tratamiento preventivo para una persona antes del contacto con otra persona con síntomas típicos de una enfermedad de acuerdo con la reivindicación 6 o con otra persona que ha dado positivo para un virus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 55 11. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde un componente del extracto de *Trigonella foenum-graecum* disminuye la capacidad del virus para replicarse al disminuir su capacidad para unirse a una célula hospedera, penetrar en una célula hospedera, replicar/transcribir su material genético y/o liberarse de una célula hospedera.
12. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el componente del extracto de *Trigonella foenum-graecum* entra en contacto con un componente de la membrana lipídica del virus.
13. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, donde el componente de extracto de *Trigonella foenum-graecum* efectúa un cambio en la membrana lipídica viral, tal como una disminución de la integridad estructural de esta membrana.
14. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, donde el componente de extracto de *Trigonella foenum-graecum* efectúa un cambio en una membrana celular de una célula hospedera.

DIBUJOS

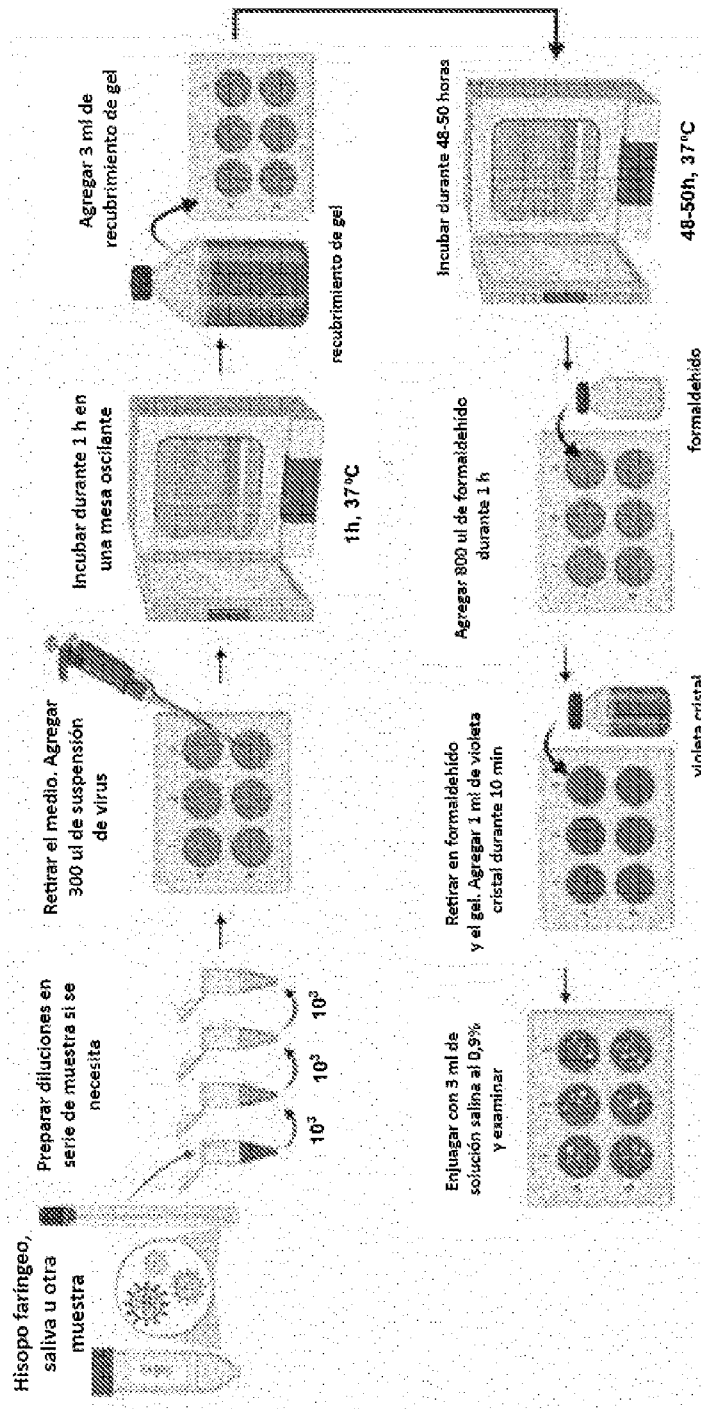


Fig. 1

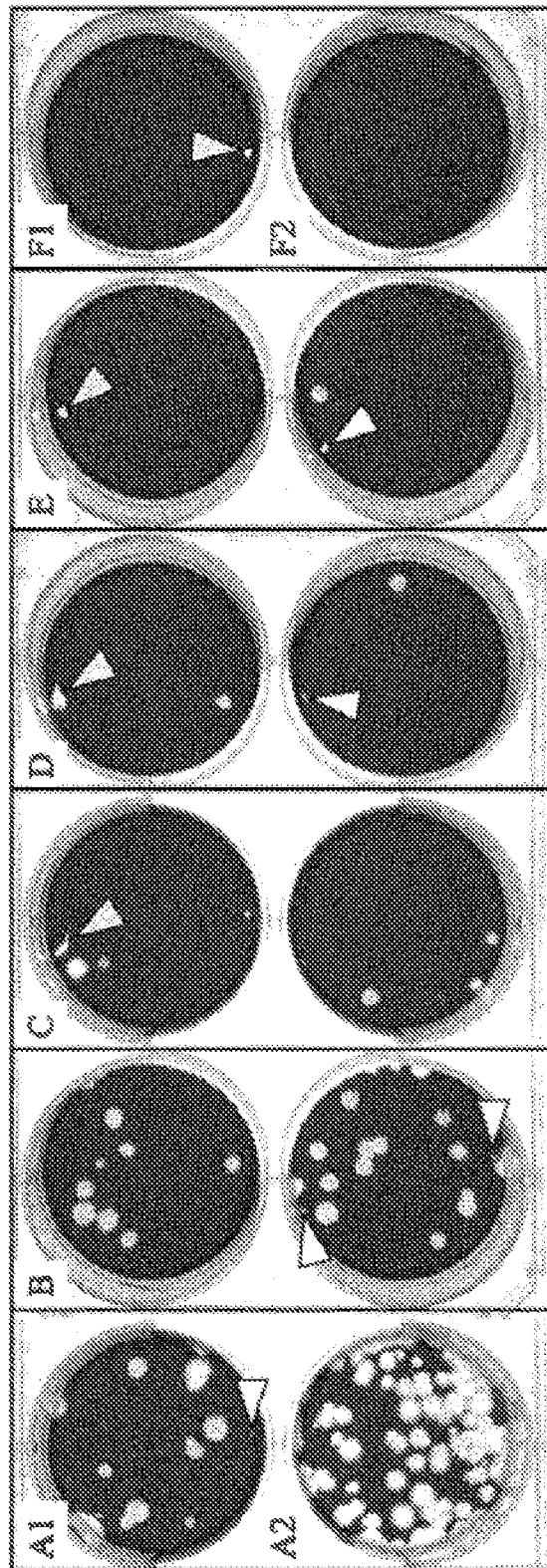


Fig. 2

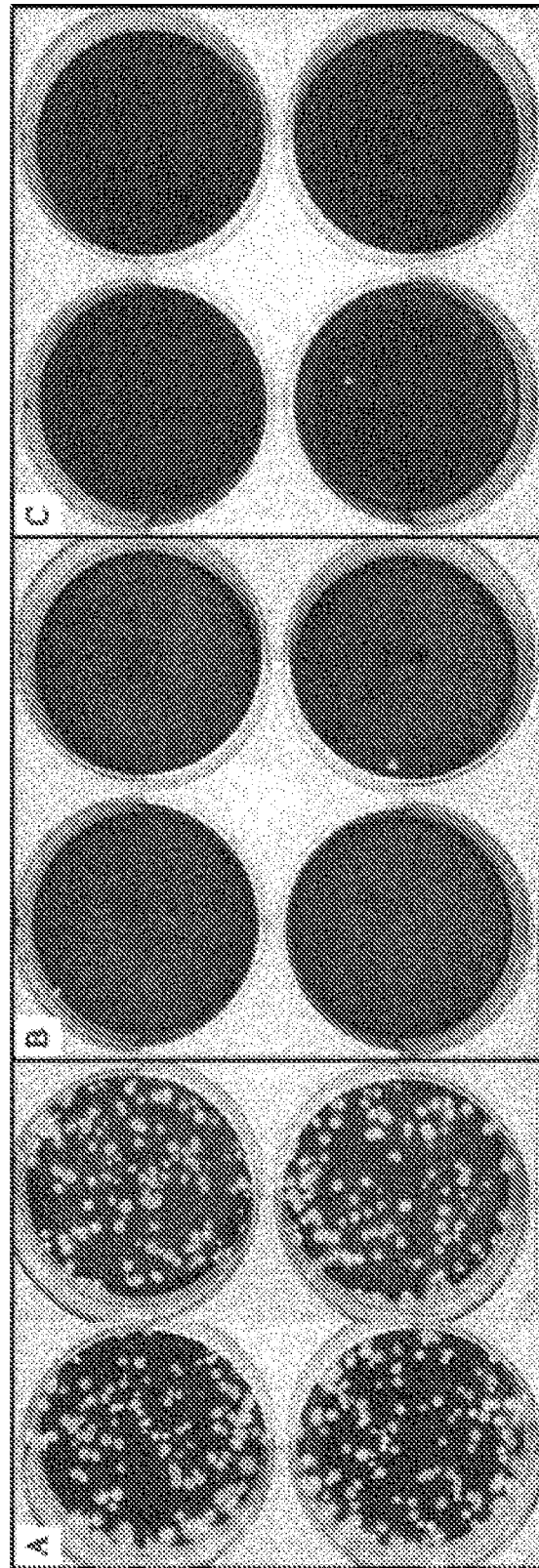


Fig. 3

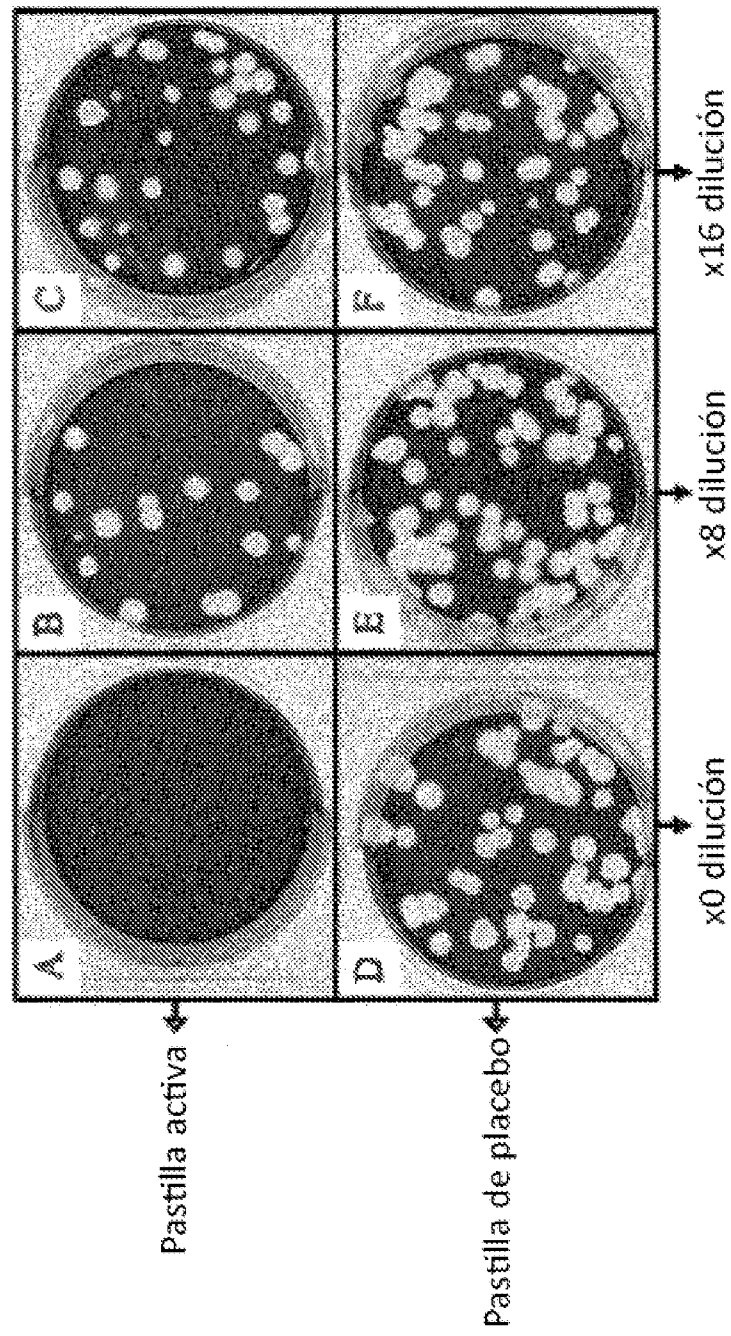


Fig. 4

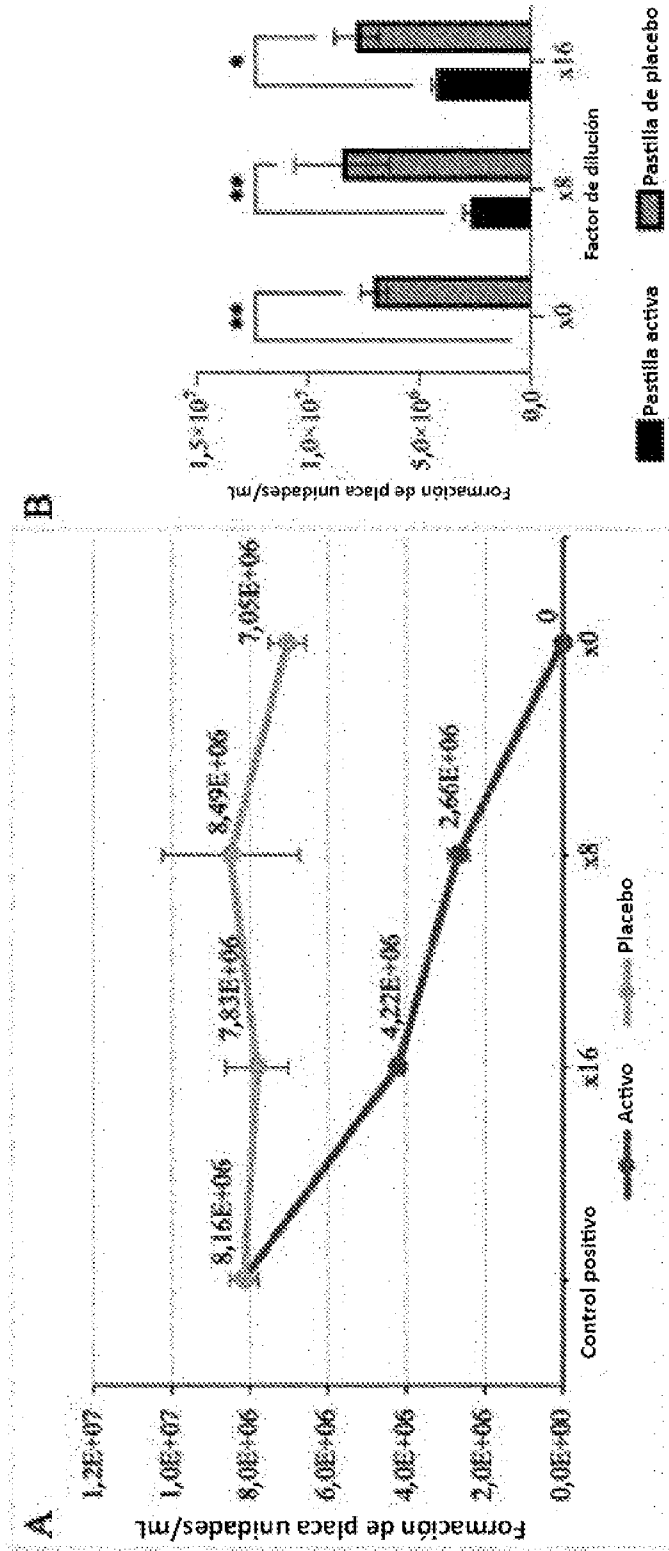


Fig. 5

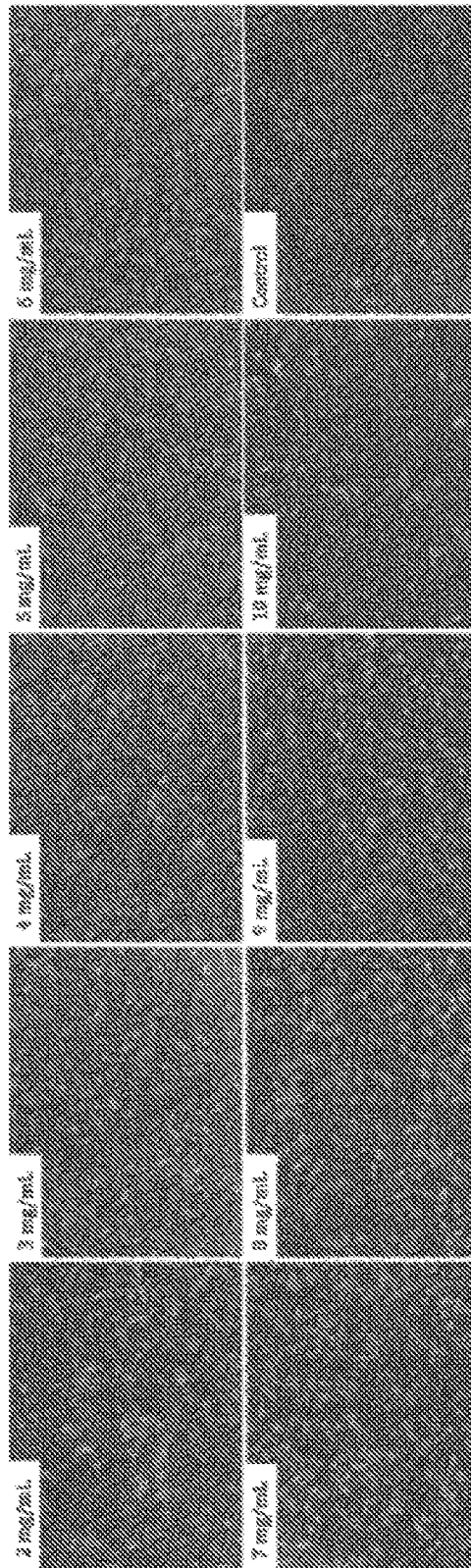


Fig. 6

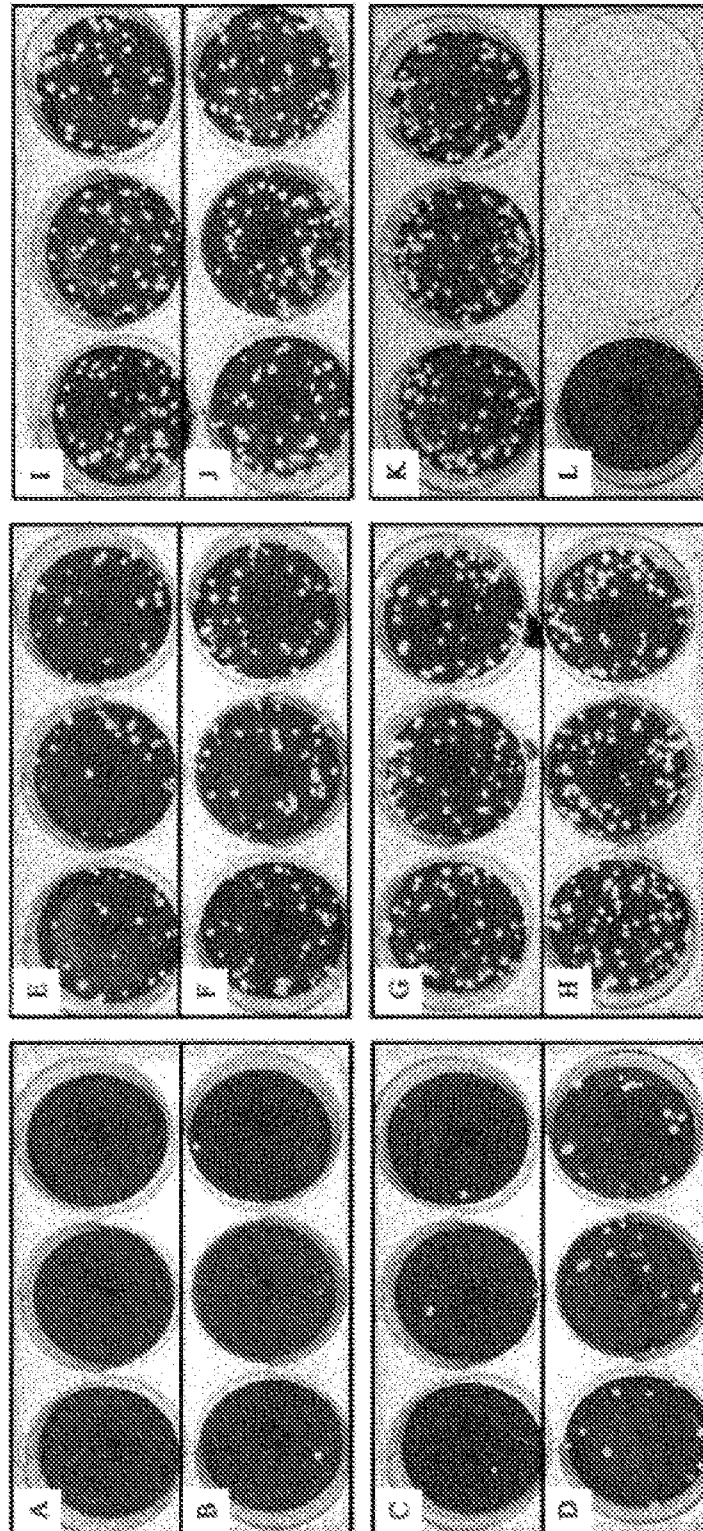


Fig. 7

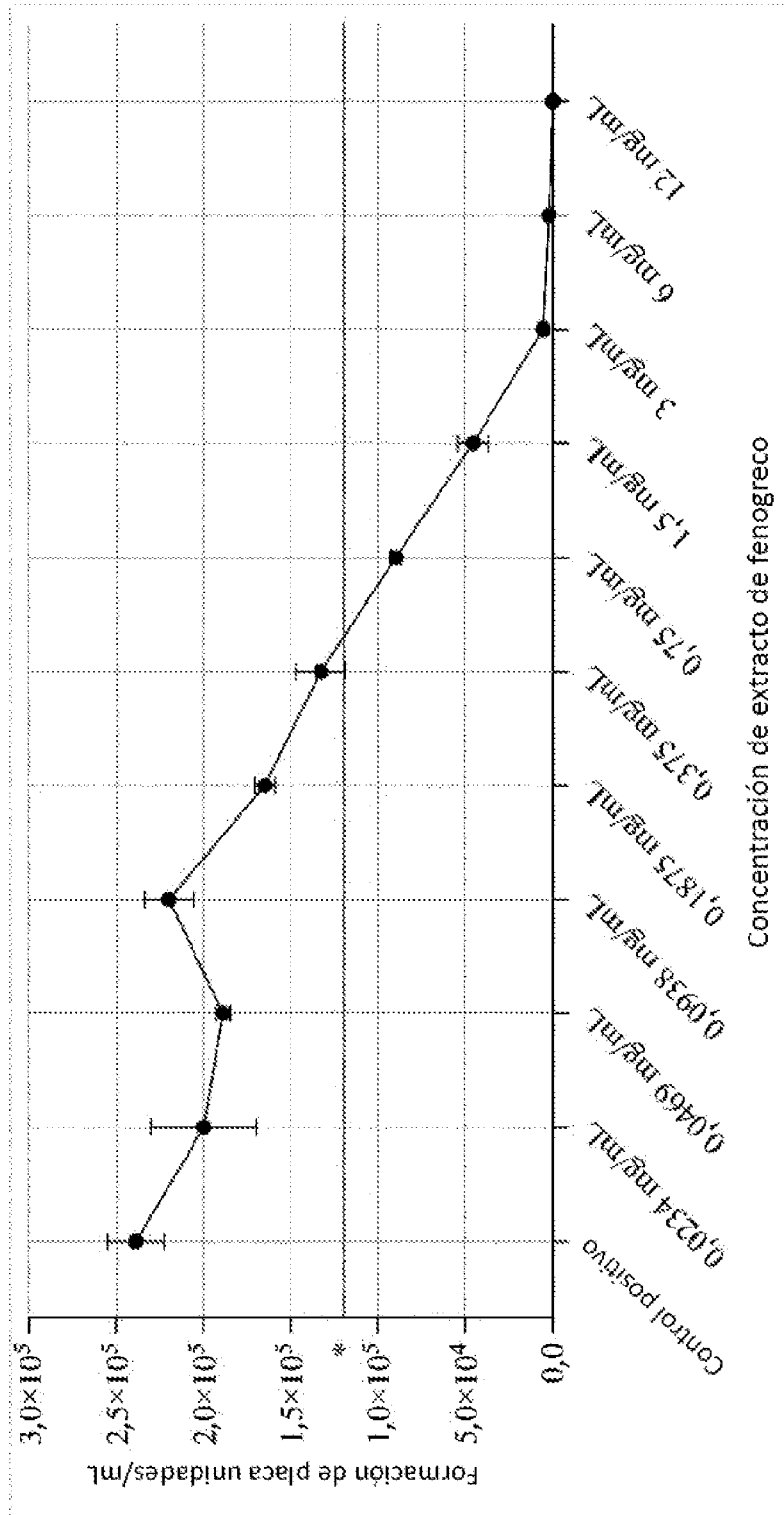


Fig. 8

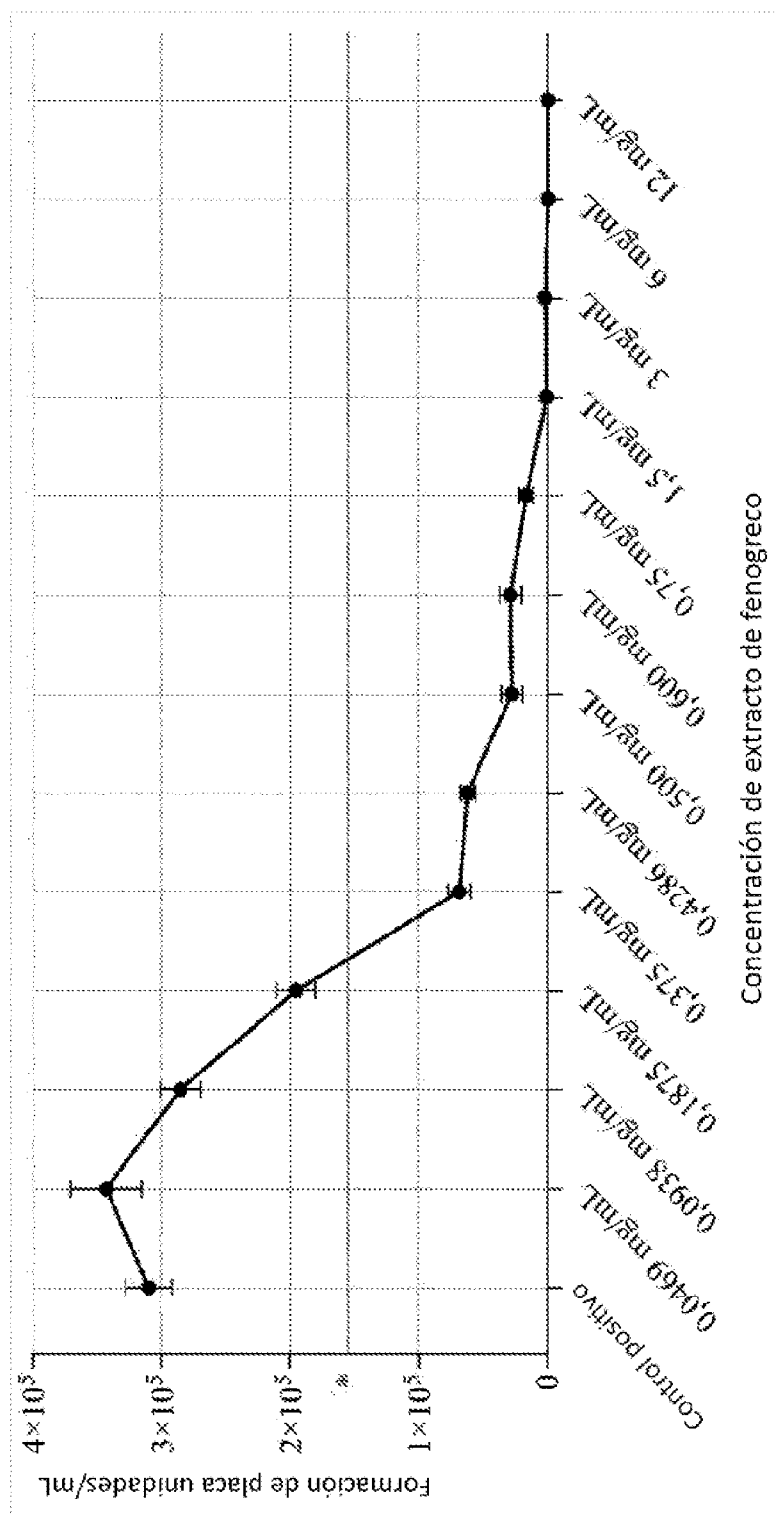


Fig. 9

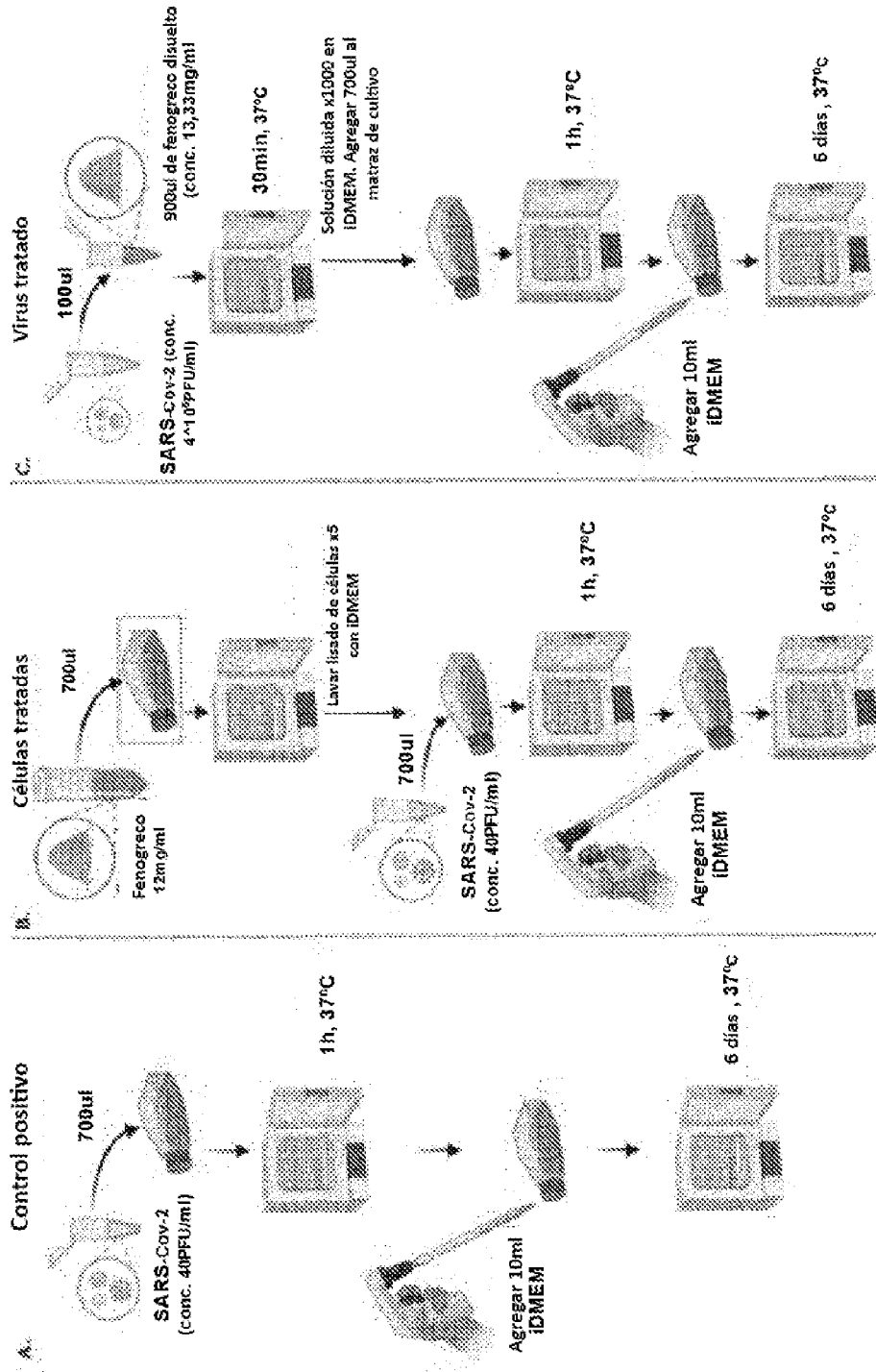


Fig. 10

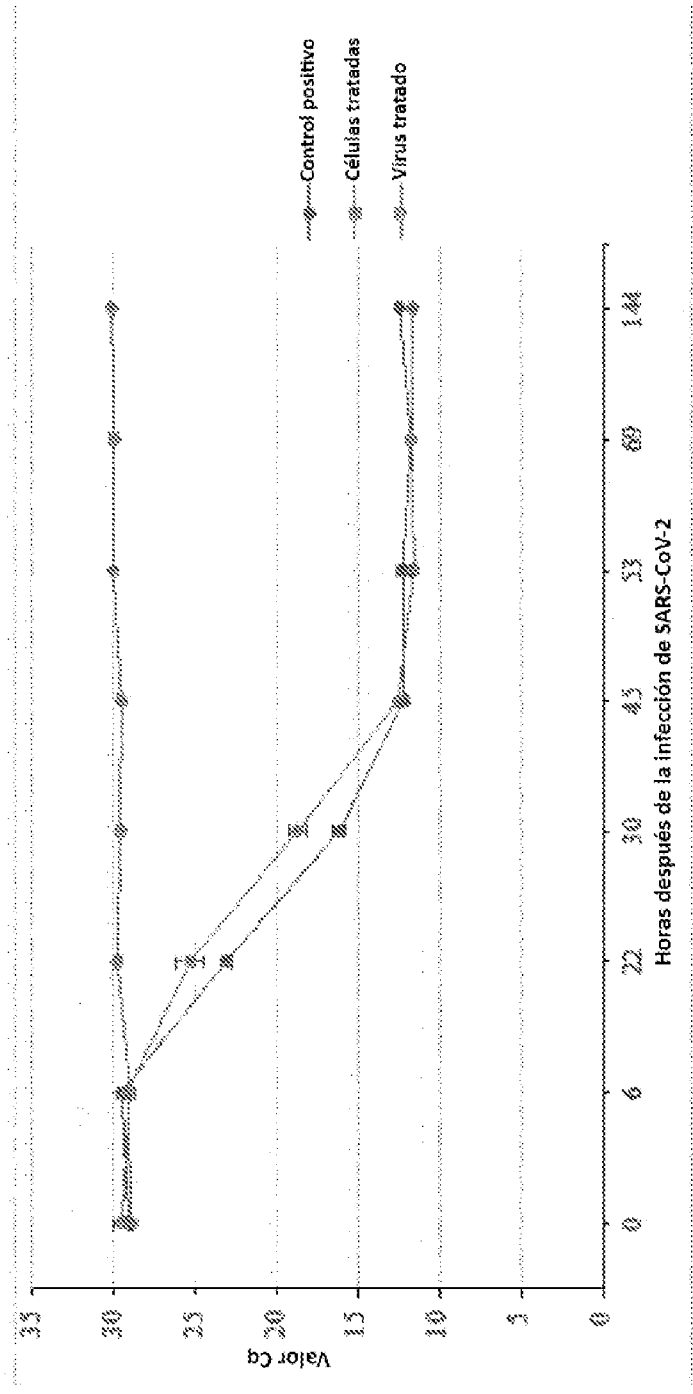
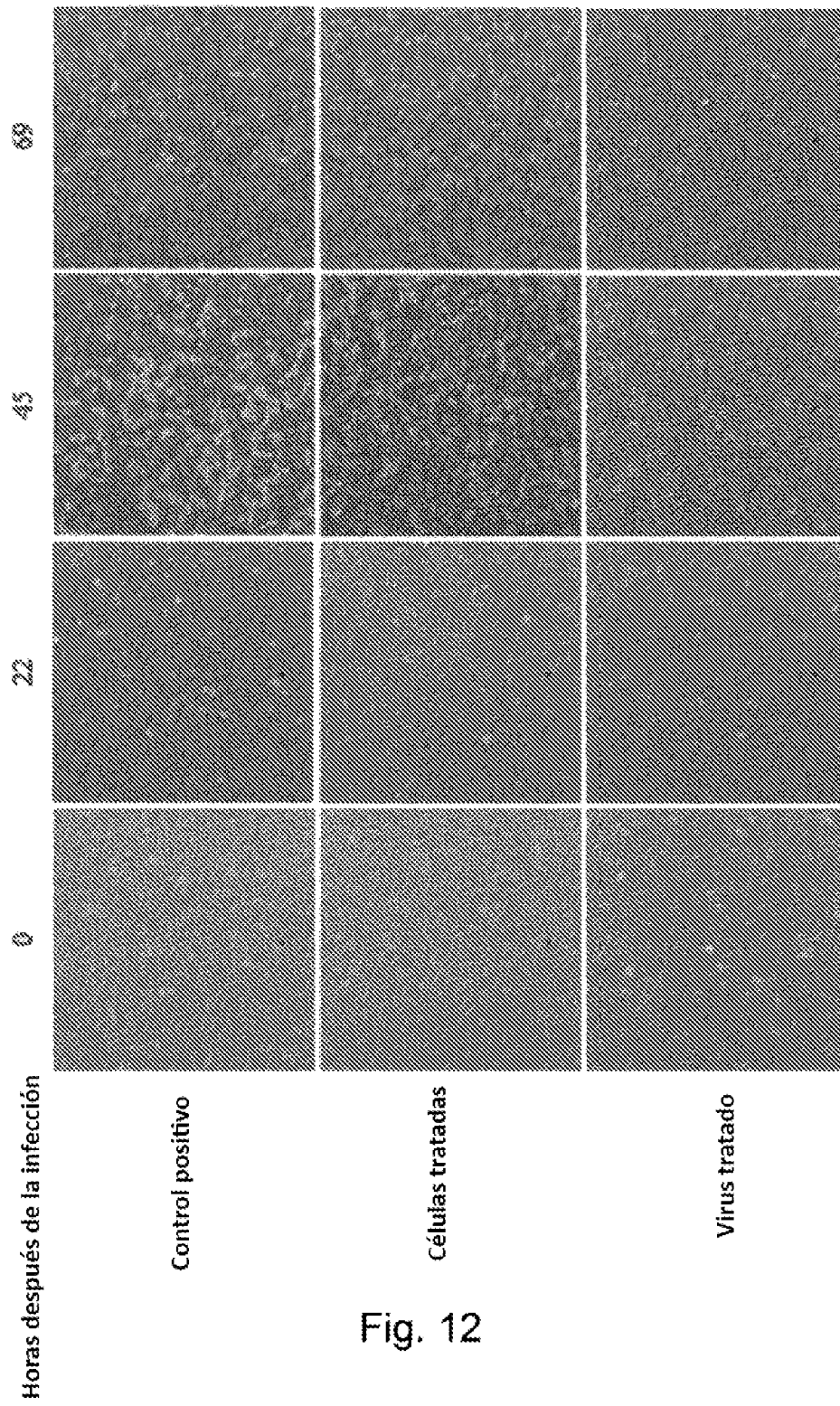


Fig. 11



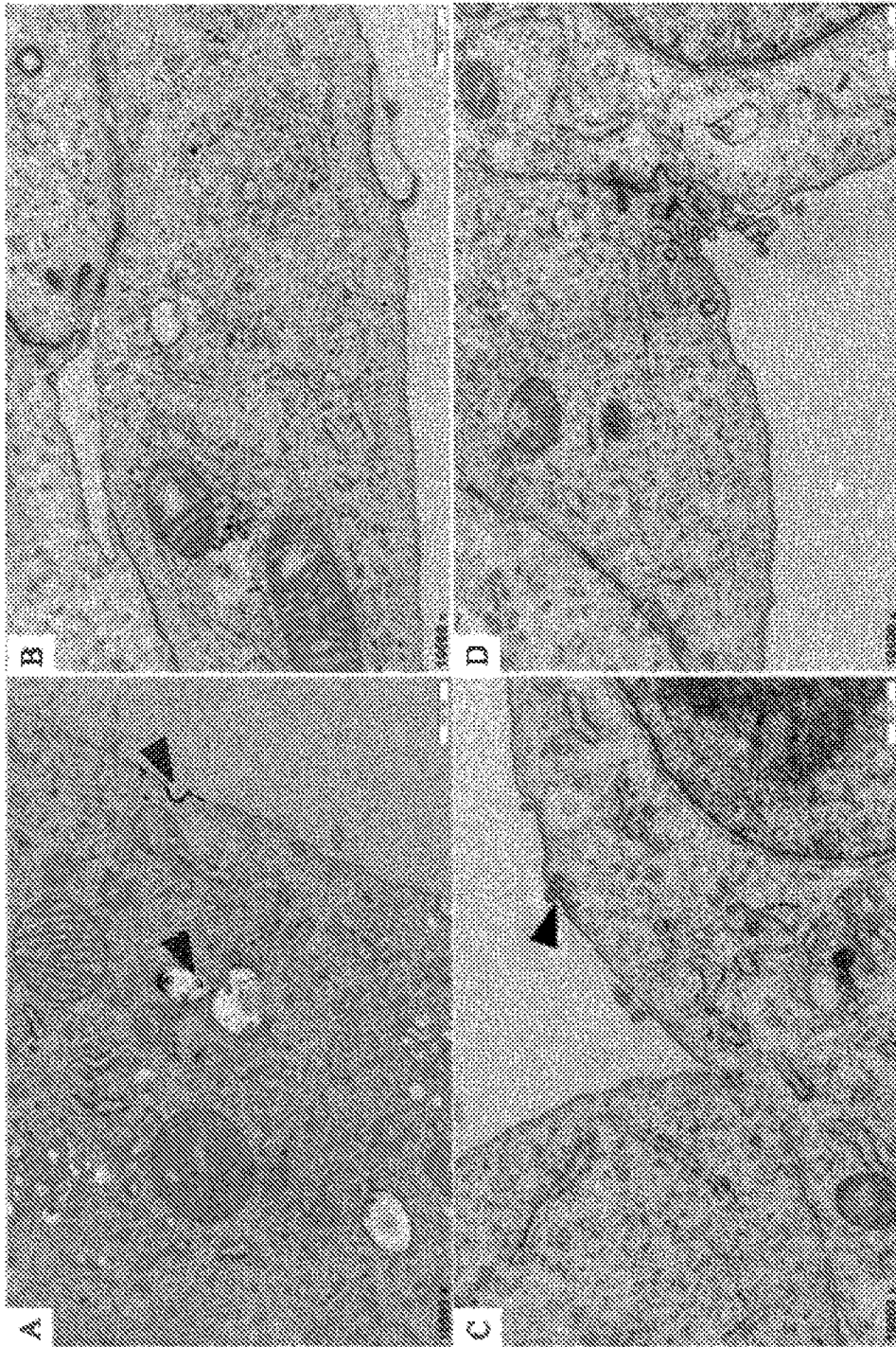


Fig. 13

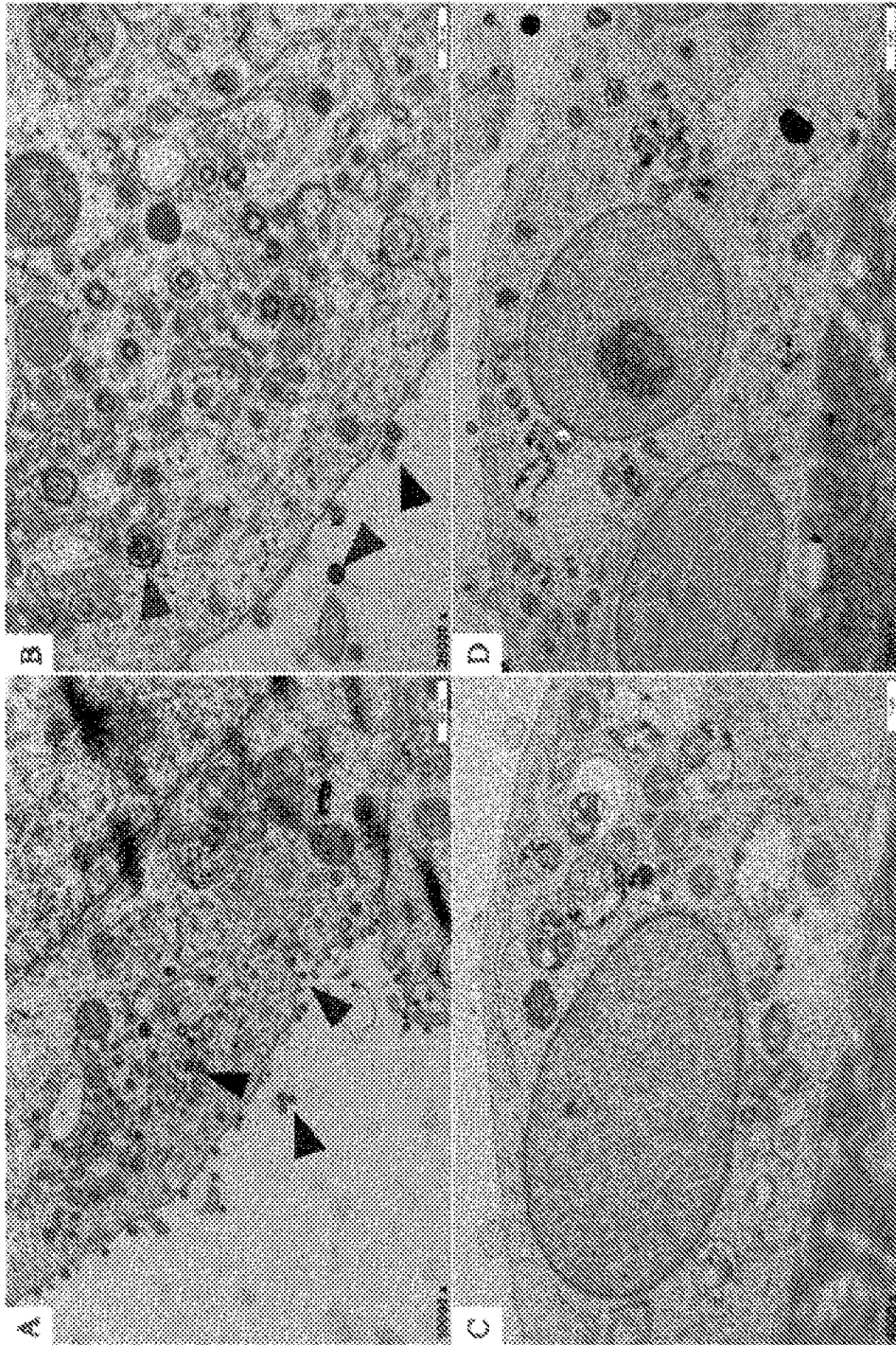


Fig. 14

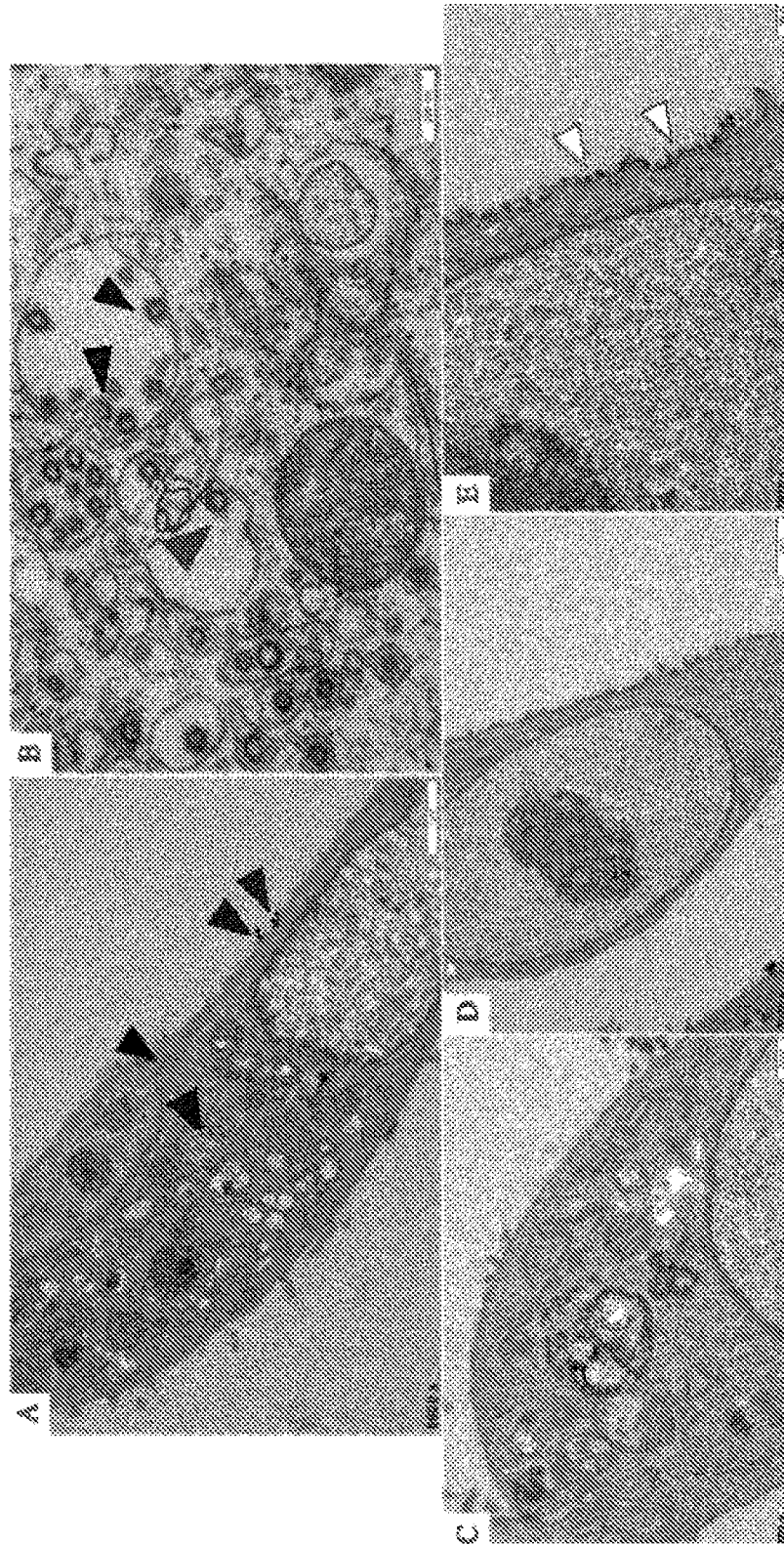


Fig. 15

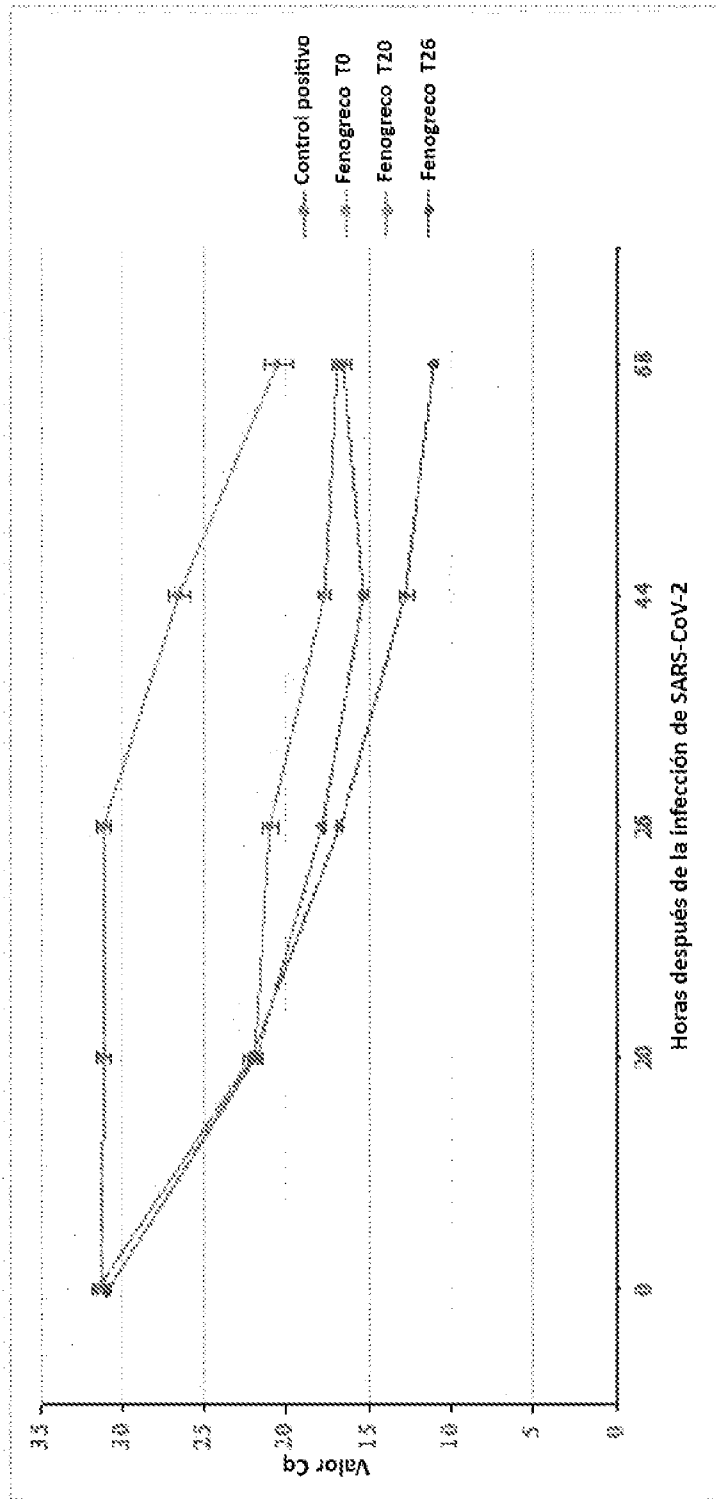


Fig. 16

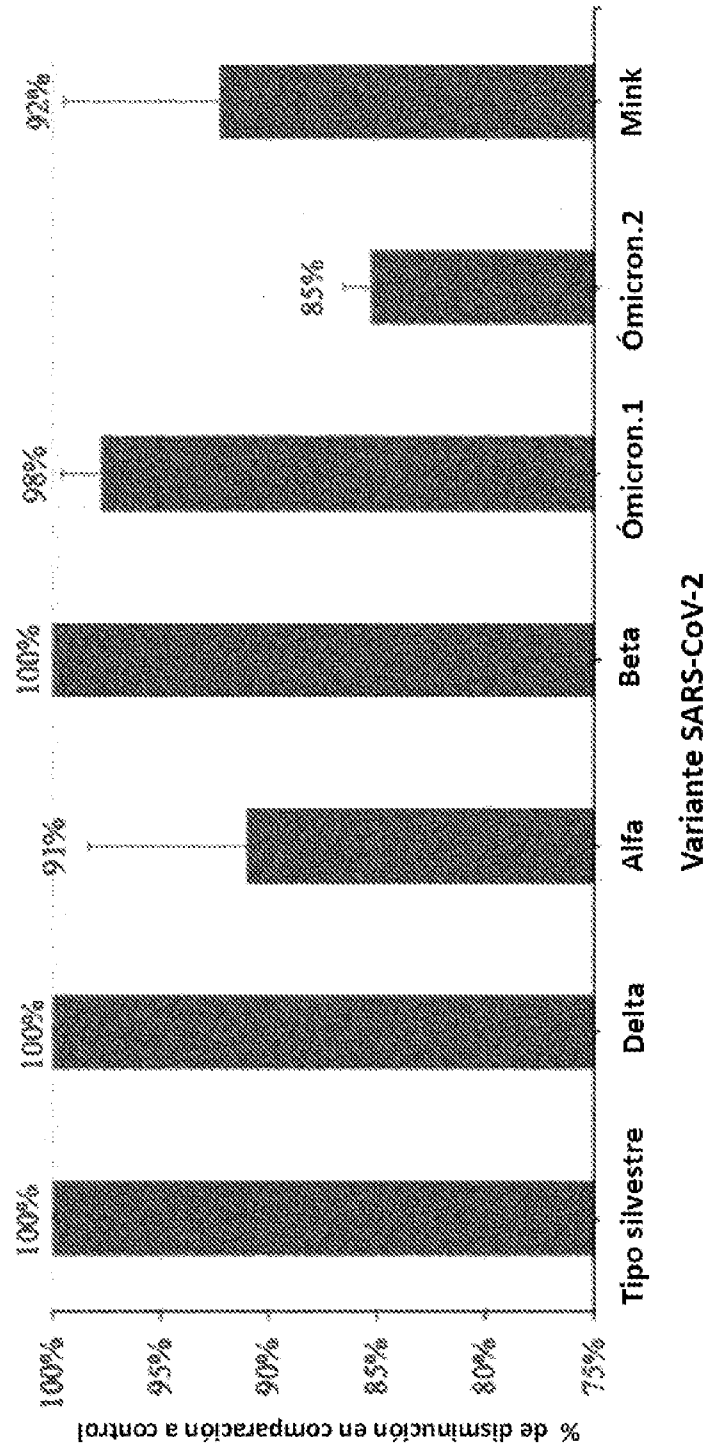


Fig. 17

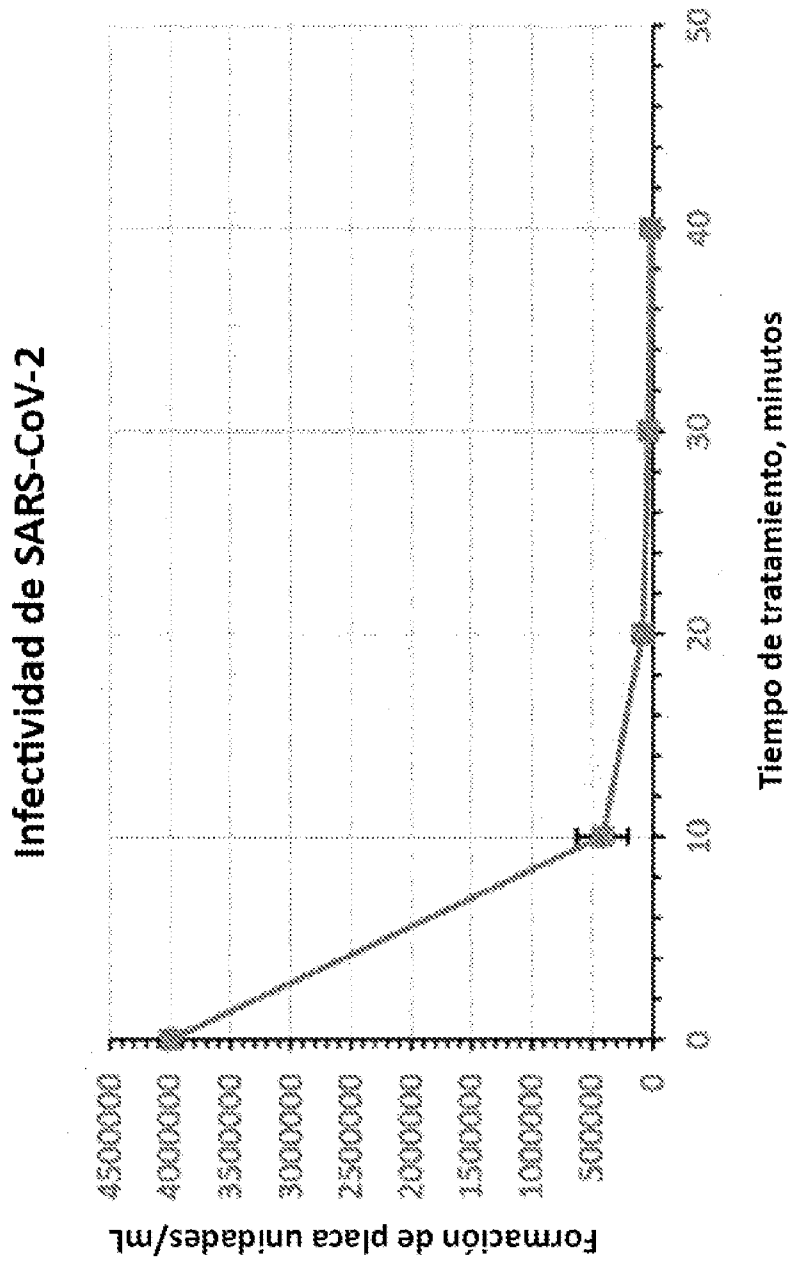


Fig. 18

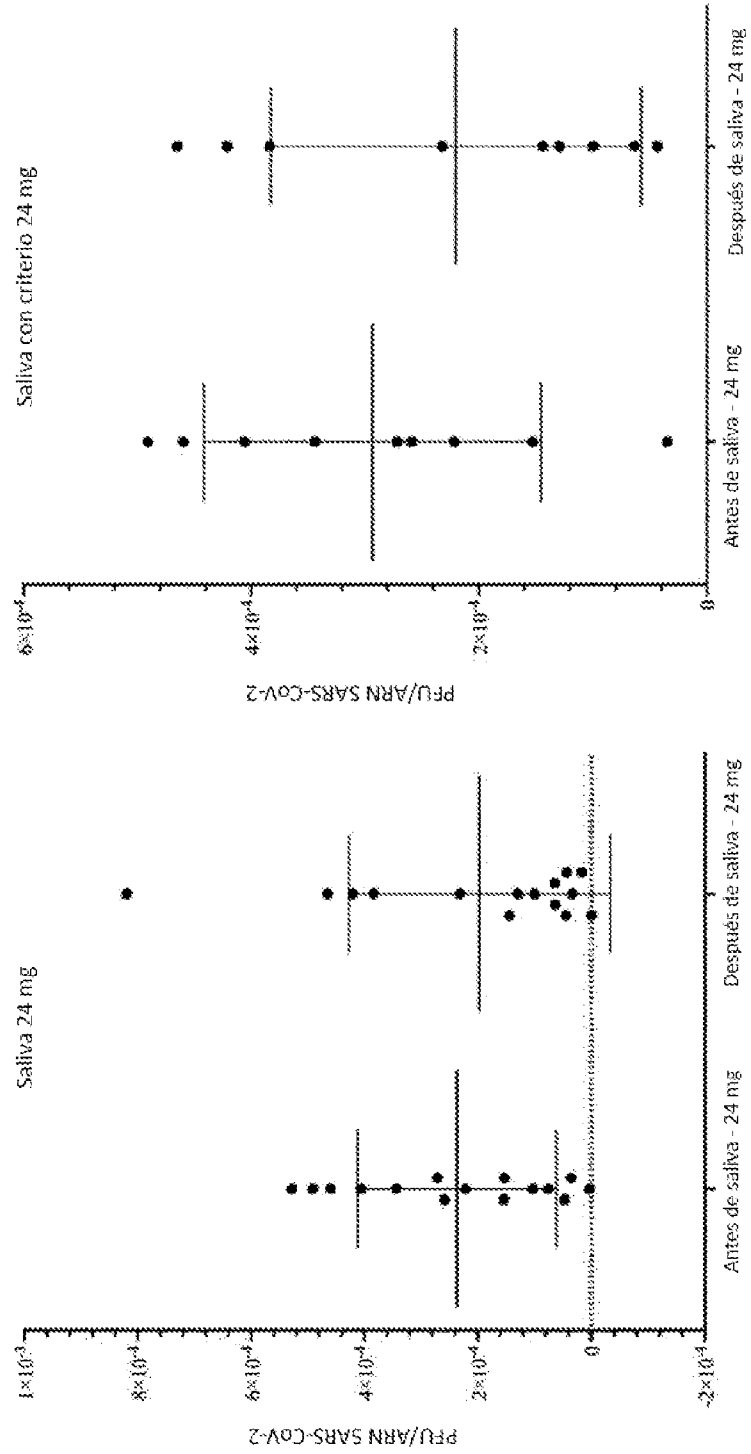


Fig. 19

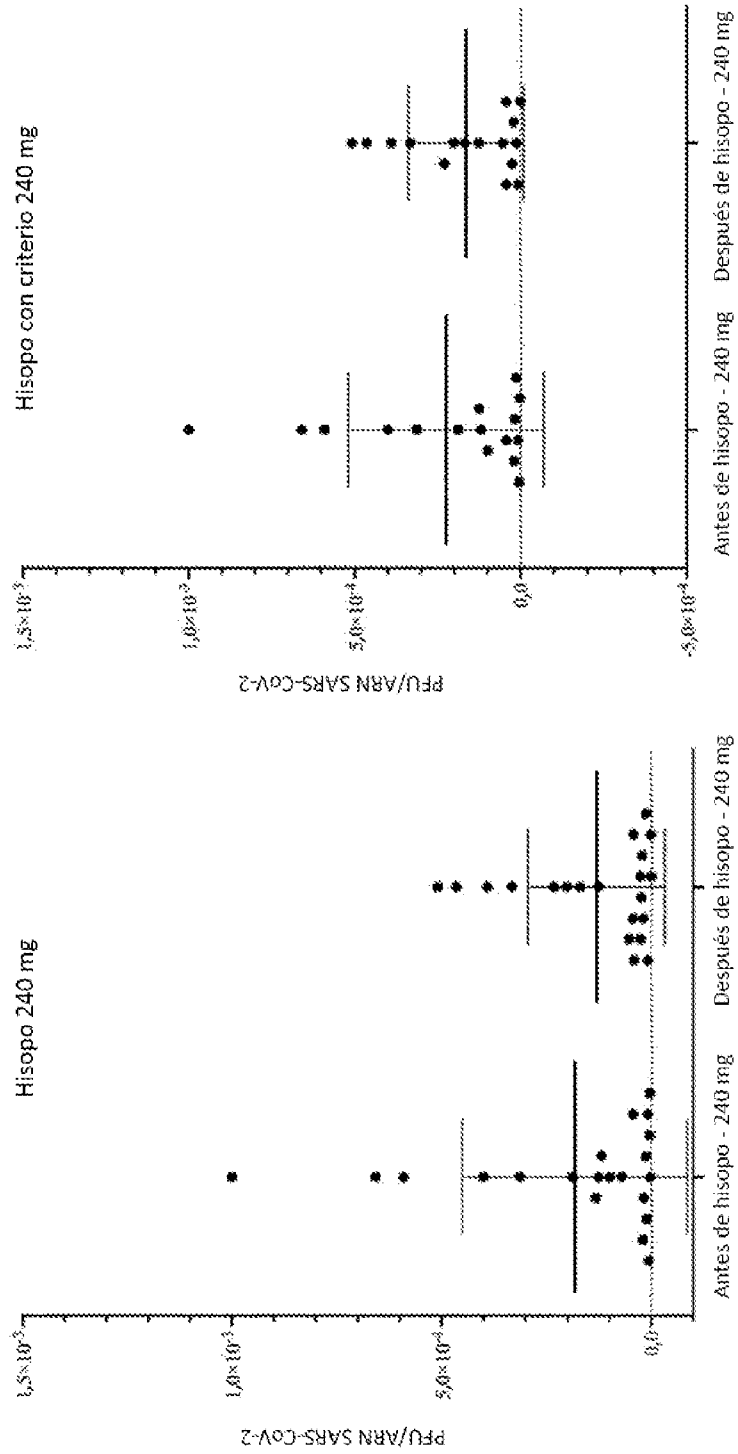


Fig. 20

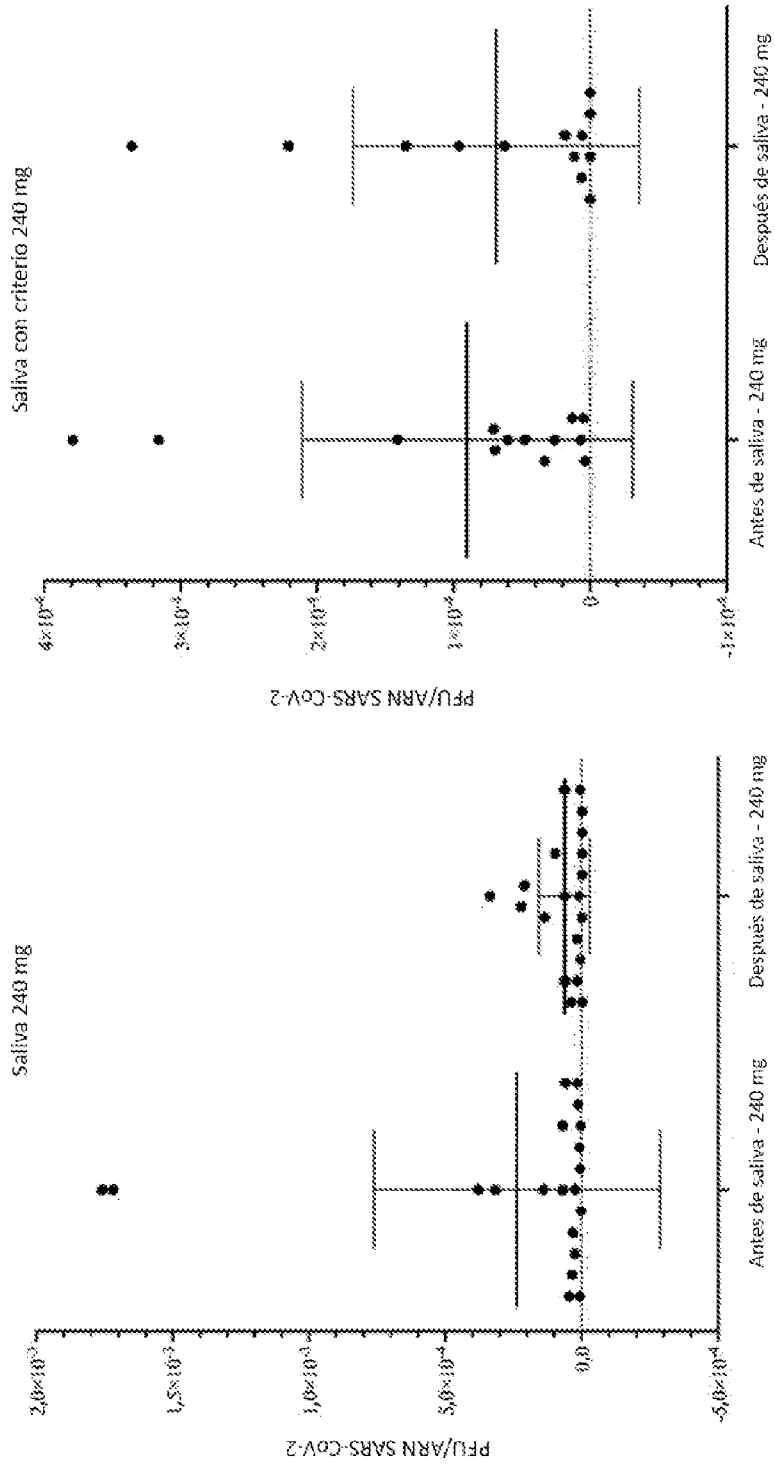


Fig. 21

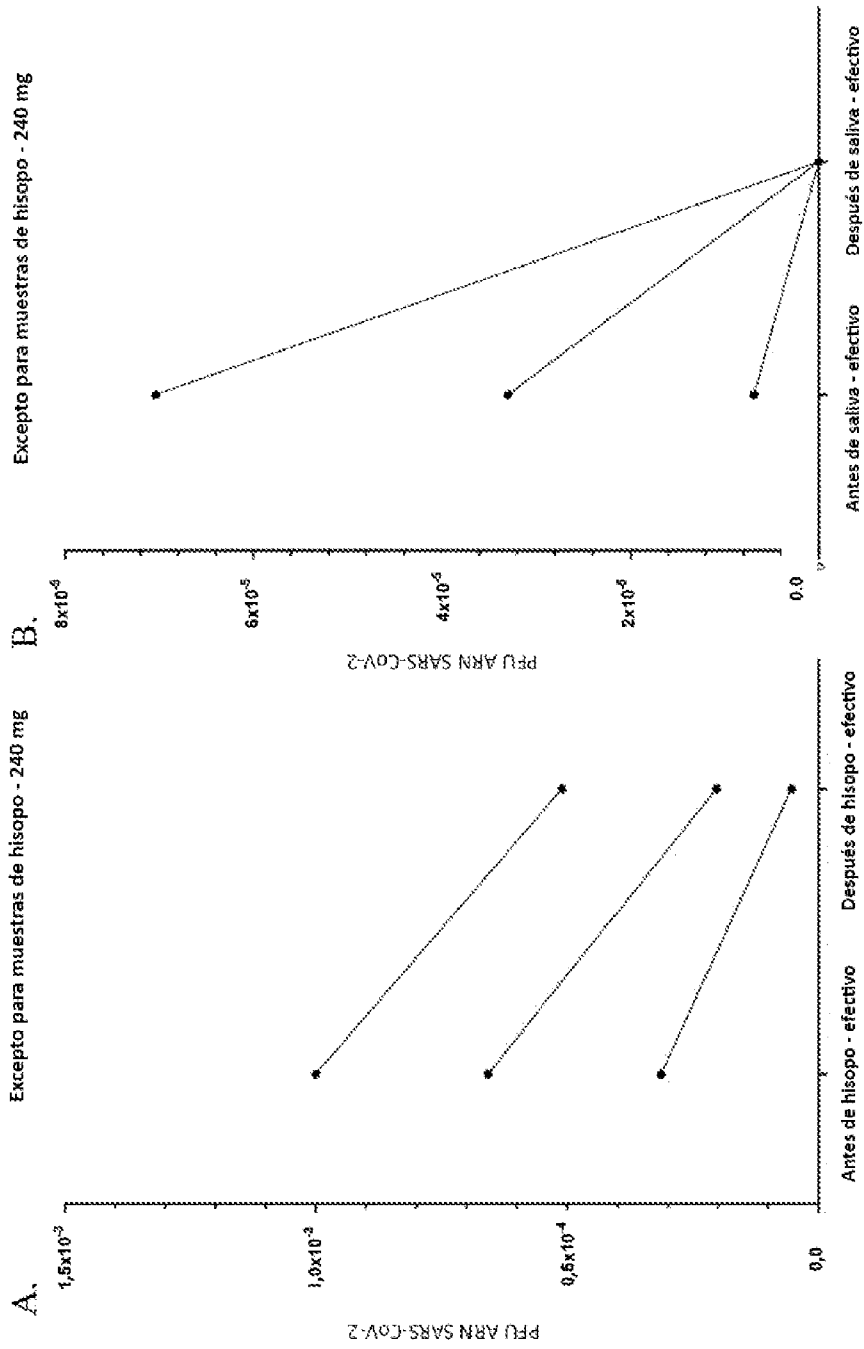


Fig. 22

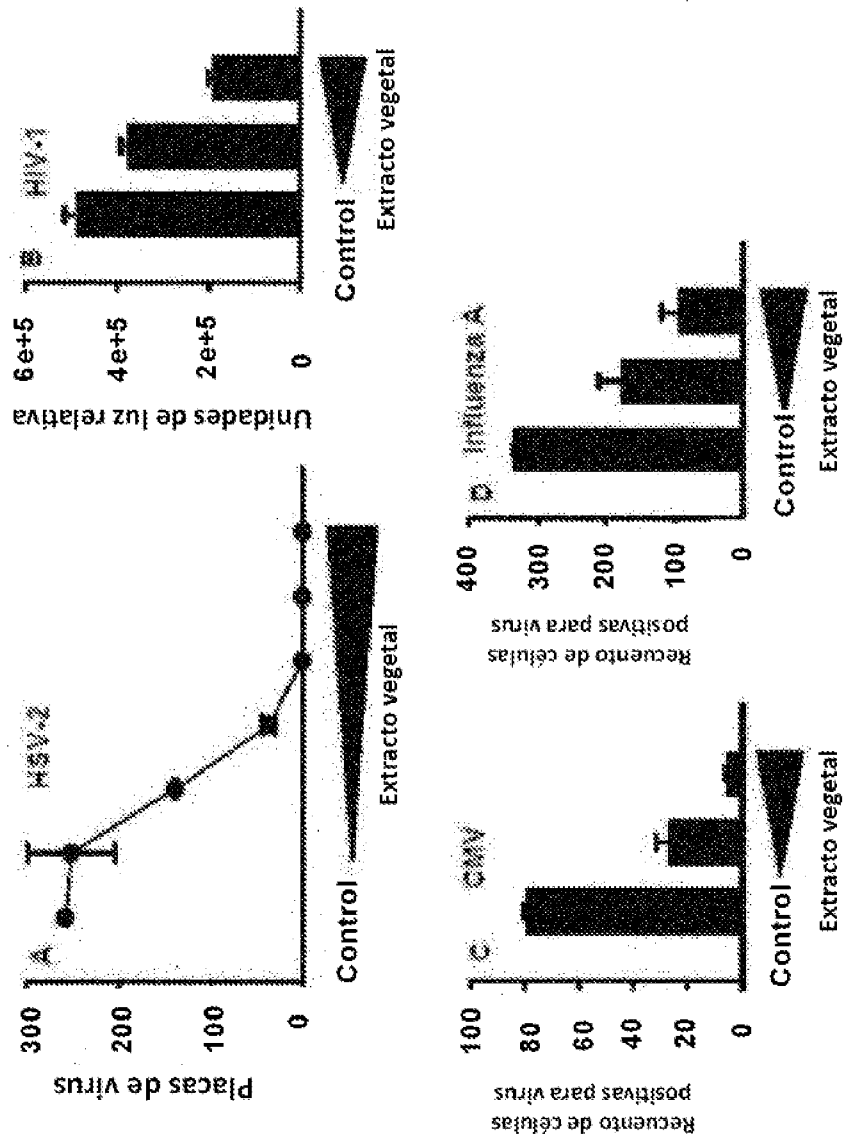


Fig. 23