

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 969 066**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7048 (2006.01)

A61K 36/48 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

A61P 11/12 (2006.01)

A61P 11/02 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2016** **PCT/IB2016/055565**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017** **WO17046777**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2016** **E 16845822 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2023** **EP 3349748**

54 Título: **Composiciones que comprenden extractos de Fenogreco y métodos para producirlas**

30 Prioridad:

19.09.2015 IN 918MU2015

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

16.05.2024

73 Titular/es:

INDUS BIOTECH PRIVATE LIMITED (100.0%)
1 Rahul Residency, Plot Nos. 6 & 7, Off Salunke
Vihar Road, Kondhwa
Pune, Maharashtra 411048, IN

72 Inventor/es:

BHASKARAN, SUNIL y
VISHWARAMAN, MOHAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 969 066 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

Composiciones que comprenden extractos de Fenogreco y métodos para producirlas

Campo técnico

La presente descripción se refiere ampliamente al campo de la fitoquímica, la biotecnología y la bioquímica. Específicamente, la presente descripción se refiere a una composición que comprende Trigofenósido, Vitexina, Isovitexina, Vitexina-2-O-Ramnósido, Vicenina-1 y fibra, opcionalmente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable; y a un método para preparar dicha composición. La presente descripción también se refiere a la composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre hipoxia, hipertensión pulmonar, fibrosis pulmonar y sinusitis, o cualquier combinación de estas.

Antecedentes y técnica anterior

El Fenogreco (*Trigonella foenum-graecum*), al ser rico en fitoquímicos, se ha usado tradicionalmente como planta alimenticia, forrajera y medicinal. El Fenogreco tiene una larga historia de usos médicos en la medicina ayurvédica y china, y se ha usado para numerosas indicaciones, que incluyen la inducción del parto, la ayuda a la digestión y como tónico general para mejorar el metabolismo y la salud.

El Fenogreco es rico en sus constituyentes químicos. La semilla del Fenogreco contiene aproximadamente de un 45% a un 60% de carbohidratos, principalmente fibra mucilaginosa (galactomananos); proteínas con alto contenido en lisina y triptófano; aceites fijos como lípidos; alcaloides de tipo piridina, principalmente trigonelina, colina, gentianina y carpaina; flavonoides como apigenina, luteolina, orientina, quercetina, vitexina e isovitexina; aminoácidos libres como 4-hidroxiisoleucina, arginina, histidina y lisina; calcio y hierro; saponinas, como glucósidos que producen sapogeninas esteroideas por hidrólisis (como diosgenina, yamogenina, tigogenina, neotigogenina); colesterol y sitosterol; vitaminas A, B1, C y ácido nicotínico; aceites volátiles como n-alcanos y sesquiterpenos; y azúcares como rafinosa, estaquiosa, sacarosa, fructosa, manosa, verbascosa y xilosa. Las semillas también contienen fenugrina saponina B y compuestos cumarínicos. La semilla también es responsable de aproximadamente el 8% del aceite fijo y maloliente. También se han identificado varias flavonas de glucósido C en las semillas del fenogreco. Estas incluyen vitexina, glucósido de vitexina y un arabinósido de orietina (iso-orientina), sapogeninas esteroideas menores (fenogrecina, esmilagenina, sarsasapogenina, yucagenina) y hasta un 50% de fibra mucilaginosa.

Estos diferentes componentes químicos han mostrado diversos efectos terapéuticos. El componente llamado fenogrecina, un éster peptídico de la sapogenina esteroidea, tiene propiedades hipoglucemiantes y ha demostrado una función pancreática mejorada. Ayuda a retrasar el vaciamiento gástrico, retardar la absorción de carbohidratos e inhibir el transporte de glucosa en seres humanos. Se sugiere que la trigonelina ejerce efectos hipoglucemiantes en pacientes sanos sin diabetes. Se cree que las saponinas esteroideas (diosgenina, yamogenina, tigogenina y neotigogenina) inhiben la absorción y síntesis del colesterol y, por tanto, su papel potencial en la arteriosclerosis. También se usa tópicamente para tratar la inflamación y promover la lactancia posparto en animales. En la actualidad, la diosgenina, una sapogenina esteroidea, se usa en la fabricación de píldoras anticonceptivas. Los fenólicos vegetales tienen beneficios potenciales para la salud principalmente debido a sus propiedades antioxidantes, como la eliminación e inhibición de especies reactivas de oxígeno (ROS), la eliminación de electrófilos y la quelación de metales. También se ha informado que exhiben propiedades farmacológicas como actividad antitumoral, antiviral, antimicrobiana, antiinflamatoria, hipotensora y antioxidante.

Por lo tanto, se investigan diferentes componentes químicos y actividades terapéuticas del fenogreco. Se informa que el fenogreco es un cultivo cultivado en varias partes de Europa, como en Austria, Francia, Alemania, Grecia, Portugal, Rusia, España, Suiza, Turquía y el Reino Unido; África del Norte, como Egipto, Etiopía, Kenia, Marruecos, Sudán, Tanzania y Túnez; Asia occidental y meridional, como China, India, Irán, Israel, Japón, Líbano y Pakistán; América del Norte, del Sur y Australia.

El crecimiento y la distribución de las plantas están limitados por factores ambientales. Los aspectos ambientales que afectan al crecimiento de las plantas y la distribución fitoquímica son la luz, la temperatura, el agua (humedad) y la nutrición. Estas condiciones ambientales son diferentes en diferentes lugares geográficos del mundo. Han mostrado efectos destacados sobre el crecimiento de las plantas, la distribución química de principios activos en términos de calidad y cantidad y también sobre la diversidad genética.

Sin embargo, debido a las necesidades cada vez mayores de la población en desarrollo, existe la necesidad de identificar y aislar componentes específicos disponibles en fuentes biológicas como el Fenogreco, para varias aplicaciones.

El oxígeno es esencial para la vida. Los carbohidratos y los ácidos grasos son los combustibles más importantes para generar ATP en las células animales. La respiración en las células animales depende del oxígeno. Los electrones de los enlaces químicos de la fuente de combustible se combinan con iones de oxígeno e hidrógeno para formar agua y dióxido de carbono. Las células acoplan esta reacción a la producción de ATP. Se requiere fosfato de alta energía en forma de ATP para muchos procesos sintéticos y degradativos dentro de la célula. Estos incluyen el transporte de membrana, la síntesis de proteínas, la lipogénesis y las reacciones de desacilación-reacilación necesarias para el

recambio de fosfolípidos. El funcionamiento del cuerpo se ve afectado a causa de los bajos niveles de oxígeno en la sangre y el aire. En última instancia, esta reducción del flujo de aire y sangre afecta al transporte de oxígeno a través de los pulmones. Los niveles alterados de oxígeno en los pulmones provocan una alta presión en las arterias y venas, lo que provoca cicatrices en los tejidos y presiones arteriales y venosas anormales.

- 5 Con la depleción prolongada o aumentada de ATP, se produce una alteración estructural del aparato de síntesis de proteínas, lo que da como resultado el desprendimiento de ribosomas del retículo endoplásmico rugoso y la disociación de los polisomas en monosomas, con la consiguiente reducción de la síntesis de proteínas. En última instancia, se produce un daño irreversible en las membranas mitocondriales y lisosomales y la célula sufre necrosis.

- 10 La hipoxia es una condición patológica en la que el cuerpo o una región del cuerpo se ve privada de un suministro adecuado de oxígeno. Cuando los niveles de oxígeno son bajos durante mucho tiempo, las arterias pulmonares se contraen y sus paredes se engrosan. Esta constricción y engrosamiento aumentan la presión en las arterias pulmonares. Los trastornos pulmonares que dañan o disminuyen la cantidad de tejido pulmonar (por ejemplo, el enfisema) también disminuyen la cantidad de vasos sanguíneos en los pulmones. La disminución del número de vasos sanguíneos aumenta la presión en los vasos restantes, lo que provoca hipertensión pulmonar.

- 15 La hipertensión pulmonar (HAP) es un trastorno pulmonar poco común en el que la presión arterial en la arteria pulmonar aumenta muy por encima de los niveles normales y puede poner en peligro la vida. Se caracteriza por la remodelación vascular de la circulación arterial pulmonar distal. La remodelación observada en la HAP incluye tanto apoptosis como proliferación de células endoteliales vasculares pulmonares, depósito de proteínas de la matriz extracelular e inflamación perivascular.

- 20 El aumento de la presión venosa pulmonar generalmente es causado por trastornos que afectan al lado izquierdo del corazón y elevan la presión de la cámara izquierda, lo que en última instancia da lugar a una presión elevada en las venas pulmonares. Las presiones venosas pulmonares elevadas pueden causar daño agudo en la pared alveolar-capilar y edema posterior. Las presiones persistentemente altas pueden finalmente dar lugar a un engrosamiento irreversible de las paredes de la membrana alveolar-capilar, que disminuye la capacidad de difusión pulmonar. En la mayoría de los pacientes, la hipertensión pulmonar da lugar finalmente a una hipertrofia ventricular derecha seguida de dilatación e insuficiencia ventricular derecha. La insuficiencia ventricular derecha limita el gasto cardíaco durante el esfuerzo.

- 25 La fibrosis pulmonar (FP) se refiere a la cicatrización en los pulmones. La fibrosis pulmonar se asocia con la remodelación vascular pulmonar, que favorece el desarrollo de hipertensión pulmonar. Describe un grupo de enfermedades pulmonares en las que el engrosamiento de las paredes de los sacos aéreos (llamados alvéolos), originado por la cicatrización del tejido, dificulta la entrada de oxígeno a la sangre. Los niveles bajos de oxígeno (y el propio tejido cicatricial rígido) pueden provocar dificultad para respirar, especialmente al caminar y hacer ejercicio. La fibrosis pulmonar puede ser originada por una irritación identificable de los pulmones, pero en muchos casos se desconoce la causa.

- 35 La hipersecreción de moco de las vías respiratorias da lugar a insuficiencia respiratoria, a través de una alteración del aclaramiento mucociliar y una sobreinfección bacteriana. Los componentes principales de la familia de mucinas que forman la matriz mucosa en las vías respiratorias son MUC5AC y MUC5B. Los componentes principales del moco son proteínas grandes y muy glicosiladas (mucinas) que proporcionan a las secreciones de las vías respiratorias su viscosidad, adhesividad y elasticidad características.

- 40 Las especies reactivas de oxígeno (ROS) liberadas por los neutrófilos activados provocan la síntesis de mucina Muc5ac a través de la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico en una línea celular mucocilinderoide pulmonar humana. Además, la elastasa de neutrófilos induce la sobreexpresión de Muc5ac en células epiteliales bronquiales humanas cultivadas a través de un mecanismo dependiente de oxidantes. En la sinusitis, la mucina formada por los genes Muc5ac se obstruye en el tracto respiratorio superior, donde los pómulos y la frente se ven afectados por la secreción de moco.

- 45 En la sinusitis aguda, la infección se desarrolla rápidamente (en unos pocos días) y dura poco tiempo. Muchos casos de sinusitis aguda duran aproximadamente una semana, pero no es inusual que duren de 2 a 3 semanas (es decir, más que la mayoría de los resfriados). A veces dura más. Se dice que la sinusitis es aguda si dura de 4 a 30 días y subaguda si dura de 4 a 12 semanas. Sin embargo, en la sinusitis crónica, la sinusitis se vuelve persistente y dura más de 12 semanas.

Terapia actual

- 55 Las terapias actuales para la HAP incluyen agentes farmacológicos que 1) inhiben la PDE5, 2) antagonizan la endotelina, o 3) complementan la vía de las prostaglandinas con prostaciclina exógena. Estos tratamientos mejoran la longevidad y el rendimiento de las actividades de la vida diaria de los pacientes con HAP, pero no detienen el proceso citoproliferativo en curso que modifica inexorablemente la arquitectura vascular pulmonar y da lugar al trasplante de pulmón.

Rehabilitación pulmonar: La rehabilitación pulmonar es un programa de ejercicio estructurado para personas con

enfermedades pulmonares crónicas, que incluyen la FP y la hipoxia, con el objetivo de restaurar la capacidad del paciente para funcionar sin extrema falta de aliento. Normalmente, la rehabilitación pulmonar incluirá acondicionamiento; entrenamiento físico y ejercicios de respiración; manejo de la ansiedad, el estrés y emocional; asesoramiento nutricional; educación; y otros componentes.

- 5 Trasplante de pulmón: La fibrosis pulmonar es ahora la principal indicación para el trasplante de pulmón en los Estados Unidos; en 2013, la FP representó casi la mitad de todos los trasplantes de pulmón realizados. El trasplante puede mejorar tanto la longevidad como la calidad de vida en pacientes que no tienen otros problemas de salud importantes.

- 10 N-acetilcisteína (NAC): La NAC es un antioxidante natural. En el pasado, se pensaba que la NAC podría ayudar a proteger el pulmón del "daño oxidativo" que ocurre en algunas formas de FP. En 2014, un ensayo clínico encontró que la NAC no tenía un impacto beneficioso sustancial en la fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

Nintedanib (Ofev®): El Nintedanib es un fármaco anti-fibrótico aprobado para tratar la FPI en los Estados Unidos. En ensayos clínicos, se ha demostrado que el nintedanib retarda el deterioro de la función pulmonar en la FPI leve a moderada. Se toma por vía oral dos veces al día.

- 15 Estos tratamientos mejoran la longevidad y el rendimiento de las actividades de la vida diaria de los pacientes con FP, pero no detienen la cicatrización de los tejidos pulmonares que afectan a los sacos aéreos y las vías respiratorias y dan lugar a la EPI o la FP y al trasplante de pulmón.

- 20 Existen medicamentos de venta libre para la sinusitis como el paracetamol y el ibuprofeno para aliviar el dolor y la fiebre; descongestionantes y aerosoles o gotas nasales salinas para aliviar la congestión nasal. Estos medicamentos brindan un alivio instantáneo, pero no logran detener la formación de mucosa en el tracto respiratorio superior. Es necesario desarrollar un fármaco que pueda prevenir la progresión de la enfermedad deteniendo la formación de mucosa y la obstrucción de la nariz que provoca sinusitis.

Técnica anterior:

- 25 El documento CN103304605 A describe un método para preparar un compuesto de tipo glucósido de flavonoide y glucósido de estilbeno a partir de fenogreco gracias a una tecnología de separación por cromatografía en contracorriente de alta velocidad (HSCCC), de modo que se acorte eficazmente el tiempo de separación y se superen los defectos del complicado funcionamiento, las pérdidas por desadsorción de la muestra, el bajo rendimiento, etc., de los métodos de preparación convencionales. De acuerdo con el método, la tecnología es simple, la reproducibilidad es alta, la eficacia de separación es alta; y el contenido de monómero obtenido es superior al 96,0 por ciento. El documento gira en torno a un proceso eficaz para la obtención de glicósidos y glucósidos.

- 30 El documento WO 2009121155 A2 describe compuestos de benzopirazona de fórmula (I) en la fabricación de un medicamento que es útil en el tratamiento de enfermedades, disfunciones y trastornos asociados con la monoamino oxidasa, como depresión y enfermedades relacionadas con la depresión, fobias, déficit de atención, abuso de drogas, inadaptación conductual, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y migraña. En una realización aún más particular, la enfermedad incluye depresión mayor o síntomas depresivos que no responden al tratamiento
- 35 convencional con otros antidepresivos.

- 40 El documento CN 103923074 A describe un método para extraer vitexina y trigonelina a partir de fenogreco. El método comprende varias etapas para obtener vitexina y trigonelina que contienen extracto acuoso con un rendimiento del 20% al 35%, a partir de una cierta cantidad de semillas y hojas de fenogreco. El proceso da como resultado una mayor tasa de extracción de vitexina y trigonelina y también mejora la pureza de extracción de vitexina y trigonelina. Así, el documento se centra principalmente en la obtención de una forma más pura de trigonelina y vitexina a través de un proceso patentado.

- 45 El documento CN 102920727 A proporciona un método para preparar extractos ricos en ramnósido de vitexina y glucósido de vitexina, y se relaciona con el campo de la extracción herbaria de hojas de espino. De acuerdo con el método, el ramnósido de vitexina constituye del 30 % al 55 % del extracto, mientras que el glucósido de vitexina constituye del 10 % al 35 % del extracto. El documento se centra en la obtención de dos ingredientes de alta pureza.

- 50 Lamia Yacoubi y cols. (septiembre de 2011) examinan el fenogreco (*Trigonella foenum-graecum* Linnaeus) y su extracto fenólico para determinar la inhibición de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratas. No se encuentra correlación con el aumento de la fibrosis, lo que sugiere que es poco probable que la inflamación tenga un papel directo en la fibrosis pulmonar. Los datos sugieren, por un lado, que el polifenol del fenogreco tiene una potente actividad antioxidante y, por lo tanto, tiene una potente actividad antiinflamatoria frente al modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratas, y, por otro lado, confirman que además de la inflamación, probablemente también

- 55 Madhesh Murugesan y cols. (septiembre de 2011) revelan que la administración de fenogreco es más eficaz para reducir el alcance del daño miocárdico y contrarrestó significativamente el estrés oxidativo durante el infarto de miocardio inducido por isoproterenol en ratas.

Sin embargo, ninguna de las técnicas anteriores, solas o en combinación, muestra una composición para su uso en el tratamiento de afecciones en donde los niveles de oxígeno se reducen menos de lo normal y, por lo tanto, causan una deficiencia de oxígeno en los pulmones que da lugar a enfermedades como hipoxia, hipertensión pulmonar, fibrosis pulmonar y sinusitis. Es necesario desarrollar un régimen seguro y eficaz que no sólo detenga la progresión de la enfermedad, sino que también proporcione una protección a los órganos para que no sufran daños hasta la etapa del trasplante.

Por lo tanto, la presente descripción supera los diversos inconvenientes observados en la técnica anterior y proporciona métodos para llegar a una composición con componentes activos específicos a partir de fuentes como, pero no se limitan a, fenogreco, y eliminar todos los demás principios activos como aminoácidos, alcaloides, saponinas, etc. La composición de la presente descripción es eficaz en el tratamiento de afecciones como, pero no se limitan a, hipoxia, hipertensión pulmonar, fibrosis pulmonar y sinusitis.

Declaración de la descripción

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende trigofoenósido, vitexina, iso-vitexina, vitexina-2-o-ramnósido, vicenina-1 y fibra, opcionalmente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable; en donde el trigofoenósido, la vitexina, la iso-vitexina, la vitexina-2-o-ramnósido y la vicenina-1 tienen juntos una concentración que varía del 8 % p/p al 31 % p/p; y la fibra está presente en una concentración que varía del 69% p/p al 92% p/p. En un aspecto, la presente invención también proporciona un método para obtener una composición de la invención, comprendiendo el método las acciones de: (a) extraer el material fuente en escamas de la composición con el primer disolvente a una temperatura que varía del 25 °C al 30 °C durante un periodo de tiempo de 3,8 horas a 4,2 horas para obtener el primer material fuente en escamas extraído, en donde el material fuente es *Trigonella foenum graecum*, y en donde dicho primer disolvente es un compuesto alifático seleccionado del grupo que comprende n-hexano, n-pentano y n-heptano (b) tratar el primer material fuente en escamas extraído con acetato de etilo a una temperatura que varía de 26 °C a 30°C para obtener el segundo material fuente en escamas extraído, (c) volver a extraer el segundo material fuente en escamas extraído con n-butanol a una temperatura que varía de 22 °C a 27°C durante un periodo de tiempo que varía de 7 horas a 9 horas para obtener un extracto transparente, (d) concentrar el extracto transparente para obtener una masa sólida, (e) disolver la masa sólida en un disolvente acuoso para obtener una solución transparente, (f) regenerar y lavar el adsorbente con disolvente para obtener un adsorbente regenerado y lavado, (g) pasar la solución transparente a través del adsorbente regenerado y lavado, volver a lavar el adsorbente con disolvente y eluir con un disolvente alcohólico para obtener un eluido, y (h) concentrar el eluido y opcionalmente añadir un excipiente farmacéuticamente aceptable para obtener la composición. En un aspecto, la presente invención también proporciona una composición que comprende trigofoenósido, vitexina, iso-vitexina, vitexina-2-o-ramnósido, vicenina-1 y fibra, opcionalmente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en hipoxia, hipertensión pulmonar, fibrosis pulmonar y sinusitis, o cualquier combinación de estas, en donde el trigofoenósido, la vitexina, la iso-vitexina, la vitexina-2-o-ramnósido y la vicenina-1 juntos tienen una concentración que varía del 8 % p/p al 31% p/p; y la fibra está presente en una concentración que varía del 69% p/p al 92% p/p.

Breve descripción de las figuras adjuntas

Con el fin de que la descripción se pueda entender fácilmente y poner en práctica, ahora se hará referencia a realizaciones ejemplares como se ilustra con referencia a las figuras adjuntas. Las figuras, junto con la descripción detallada a continuación, se incorporan y forman parte de la especificación, y sirven para ilustrar adicionalmente las realizaciones y explicar diversos principios y ventajas, de acuerdo con la presente descripción donde:

Las Figuras 1a y 1b son gráficos de HPLC que representan la presencia de trigofoenósido, vitexina, iso-vitexina, vitexina-2-o-ramnósido, vicenina-1 en la composición instantánea, de acuerdo con una realización.

La Figura 2a representa un gráfico de HPLC de trigofoenósido estándar; la Figura 2b representa un gráfico de HPLC de Vicenina-1 estándar; la Figura 2c representa un gráfico de HPLC de vitexina-2-o-ramnósido estándar; la Figura 2d representa un gráfico de HPLC de Vitexina estándar; y la Figura 2e representa un gráfico de HPLC de iso-vitexina estándar.

La Figura 3 es un gráfico de barras que representa el efecto de la composición instantánea sobre la alteración inducida por MCT en el contenido de oxígeno en sangre periférica (pulso Ox), de acuerdo con una realización.

La Figura 4 es un gráfico de barras que representa el efecto de la composición instantánea sobre la alteración inducida por MCT en la frecuencia respiratoria (f), de acuerdo con una realización.

La Figura 5 es un gráfico de barras que representa el efecto de la composición instantánea sobre la alteración inducida por MCT en pausa mejorada (P_{mej}), de acuerdo con una realización.

La Figura 6a es un gráfico de barras que representa el efecto de la composición instantánea sobre la alteración inducida por MCT en la dP/dt_{min} ventricular derecha; y la Figura 6b es un gráfico de barras que representa el efecto de la composición instantánea sobre la alteración inducida por MCT en la dP/dt_{max} ventricular derecha, de acuerdo con una realización.

La Figura 7a es un gráfico de barras que representa el efecto de la composición instantánea sobre la alteración inducida por MCT en el índice de contractilidad, y la Figura 7b es un gráfico de barras que representa el efecto de la composición instantánea sobre la alteración inducida por MCT en tau, de acuerdo con una realización.

5 La Figura 8 es un gráfico que representa el efecto de la composición instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en el tiempo inspiratorio (Ti), de acuerdo con una realización.

La Figura 9 es un gráfico que representa el efecto de la composición instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en el tiempo espiratorio (Te), de acuerdo con una realización.

La Figura 10 es un gráfico que representa el efecto de la composición instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en pausa mejorada (P_{mej}), de acuerdo con una realización.

10 La Figura 11 es un gráfico de barras que representa el efecto de la composición instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en el contenido de oxígeno en sangre periférica (pulso Ox), de acuerdo con una realización.

La Figura 12 es un gráfico de barras que representa el efecto de la composición instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en la expresión del ARNm de Muc5ac en pulmón, de acuerdo con una realización.

15 La Figura 13 es un gráfico de barras que representa el efecto de la composición instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en la expresión del ARNm de NF-kB en pulmón, de acuerdo con una realización.

Descripción detallada de la descripción

20 La presente descripción se refiere a una composición que comprende Trigofenósido, Vitexina, Iso-vitexina, Vitexina-2-o-ramnósido, Vicenina-1 y fibra, opcionalmente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde el Trigofenósido, la Vitexina, la Iso-vitexina, la Vitexina-2-o-ramnósido y la Vicenina-1, juntos tienen una concentración que varía del 8 % p/p al 31 % p/p; y la fibra está presente en una concentración que varía del 69% p/p al 92% p/p.

La presente descripción también se refiere a un método para obtener una composición que comprende Trigofenósido, Vitexina, Iso-vitexina, Vitexina-2-o-ramnósido, Vicenina-1 y fibra, opcionalmente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicho método las acciones de:

25 a) extraer el material fuente en escamas de la composición con el primer disolvente a una temperatura que varía de 25 °C a 30 °C durante un periodo de tiempo de 3,8 horas a 4,2 horas para obtener el primer material fuente en escamas extraído, en donde el material fuente es *Trigonella foenum graecum*, y en donde dicho primer disolvente es un compuesto alifático seleccionado del grupo que comprende n-hexano, n-pentano y n-heptano;

30 b) tratar el primer material fuente en escamas extraído con acetato de etilo a una temperatura que varía de 26 °C a 30 °C para obtener el segundo material fuente en escamas extraído;

c) volver a extraer el segundo material fuente en escamas extraído con n-butanol a una temperatura que varía de 22 °C a 27 °C durante un periodo de tiempo que varía de 7 horas a 9 horas para obtener un extracto transparente;

d) concentrar el extracto transparente para obtener masa sólida;

35 e) disolver la masa sólida en un disolvente acuoso para obtener una solución transparente;

f) regenerar y lavar el adsorbente con disolvente para obtener adsorbente regenerado y lavado;

g) pasar la solución transparente a través del adsorbente regenerado y lavado, volver a lavar el adsorbente con disolvente y eluir con un disolvente alcohólico para obtener un eluido; y

40 h) concentrar el eluido y opcionalmente añadir un excipiente farmacéuticamente aceptable para obtener la composición.

En una realización de la presente descripción, dicho material fuente es de una fuente vegetal, preferiblemente *Trigonella foenum graecum*.

45 En otra realización de la presente descripción, la extracción con el primer disolvente se lleva a cabo a una temperatura que varía de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C, preferiblemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 27 °C, en un periodo de tiempo de aproximadamente 3,8 horas a aproximadamente 4,2 horas, preferiblemente de aproximadamente 4 horas; y dicho primer disolvente es un compuesto alifático seleccionado del grupo que comprende n-hexano, n-pentano y n-heptano, preferiblemente n-hexano.

En otra realización más de la presente descripción, el tratamiento con el segundo disolvente se lleva a cabo a una temperatura que varía de aproximadamente 26 °C a aproximadamente 30 °C, preferiblemente de aproximadamente

27 °C a aproximadamente 29 °C; y dicho segundo disolvente es acetato de etilo.

En otra realización más de la presente descripción, la extracción con el tercer disolvente se lleva a cabo en contracorriente a una temperatura que varía de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 27 °C, preferiblemente de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 25 °C, en un periodo de tiempo que varía de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 9 horas, preferiblemente de aproximadamente 8 horas; y dicho tercer disolvente es n-butanol.

En otra realización más de la presente descripción, la concentración se lleva a cabo mediante concentración al vacío.

En otra realización más de la presente descripción, dicho disolvente acuoso es agua desionizada.

En otra realización más de la presente descripción, dicho adsorbente es un lecho de resina, preferiblemente Amberlite XAD-16; en donde el disolvente para lavar el adsorbente se selecciona del grupo que comprende alcohol isopropílico, etanol y agua desionizada, o cualquier combinación de estos; en donde el disolvente para volver a lavar el adsorbente se selecciona del grupo que comprende solución salina de cloruro de sodio y agua, o una combinación de estos; y en donde dicho disolvente alcohólico se selecciona del grupo que comprende etanol y alcohol isopropílico, preferiblemente alcohol isopropílico.

La presente descripción se refiere además a una composición que comprende Trigofenósido, Vitexina, Iso-vitexina, Vitexina-2-o-ramnósido, Vicenina-1 y fibra, opcionalmente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que comprende hipoxia, hipertensión pulmonar, fibrosis pulmonar y sinusitis, o cualquier combinación de estas, en donde el Trigofenósido, la Vitexina, la Iso-vitexina, la Vitexina-2-o-ramnósido y la Vicenina-1, juntos tienen una concentración que varía del 8 % p/p al 31 % p/p; y la fibra está presente en una concentración que varía del 69 % p/p al 92 % p/p.

En otra realización de la presente descripción, el trigofenósido está presente en una concentración que varía de aproximadamente el 0,1 % p/p a aproximadamente el 8 % p/p; la vitexina está presente en una concentración que varía de aproximadamente el 0,5 % p/p a aproximadamente el 5 % p/p; la iso-vitexina está presente en una concentración que varía de aproximadamente el 0,5 % p/p a aproximadamente el 7 % p/p; la vitexina-2-o-ramnósido está presente en una concentración que varía de aproximadamente el 0,5 % p/p a aproximadamente el 7 % p/p; la vicenina-1 está presente en una concentración que varía de aproximadamente el 0,5 % p/p a aproximadamente el 4 % p/p; y la fibra está presente en una concentración que varía de aproximadamente el 69 % p/p a aproximadamente el 92 % p/p.

En otra realización más de la presente descripción, el excipiente farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que comprende goma, agente granulador, aglutinante, lubricante, agente desintegrante, agente edulcorante, aditivo, disolvente, deslizante, antiadherente, agente antiestático, anti-oxidante, tensioactivo, potenciador de la viscosidad, material celulósico vegetal, agente colorante, agente aromatizante, agente de recubrimiento, plastificante, conservante, agente de suspensión, agente emulsionante y agente de esferonización o cualquier combinación de estos.

En otra realización más de la presente descripción, la composición se formula en formas de dosificación seleccionadas del grupo que comprende formulación oral sólida, formulación oral líquida, formulación para inhalación, formulación nasal, formulación parenteral, fitocéticos, nutracéuticos y productos alimenticios o cualquier combinación de estos.

En otra realización más de la presente descripción, la formulación oral sólida se selecciona del grupo que comprende comprimido, cápsula, pastilla medicada, pastillas para chupar, polvo dispersable, gránulo dispersable o cualquier combinación de estas; la formulación oral líquida se selecciona del grupo que comprende suspensión, emulsión, gotas, emulsión en cápsula de gel dura o blanda, jarabe, elixir o cualquier combinación de estas; la formulación parenteral se selecciona del grupo que comprende inyección intravenosa, inyección intramuscular, depósito intramuscular, inyección subcutánea, inyección percutánea o cualquier combinación de estas; la formulación para inhalación se selecciona del grupo que comprende inhalador, inhalador de polvo seco, nebulizador o cualquier combinación de estas; y la formulación nasal se selecciona del grupo que comprende gotas nasales, aerosoles nasales o una combinación de estas.

En otra realización más de la presente descripción, la composición se administra a una dosis que varía de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal de dicho sujeto, preferiblemente que varía de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal de dicho sujeto.

En otra realización más de la presente descripción, la composición se administra como un aerosol o inhalador a una dosis que varía de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal de dicho sujeto, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 25 µg/kg de peso corporal de dicho sujeto.

En otra realización más de la presente descripción, el sujeto es un mamífero, incluido un ser humano.

La presente descripción se refiere a una composición que comprende Trigofenósido, Vitexina, Iso-vitexina, Vitexina-

2-o-ramnósido, Vicenina-1 y fibra, opcionalmente junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, en donde el Trigofoenósido, la Vitexina, la Iso-vitexina, la Vitexina-2-o-ramnósido y la Vicenina-1, juntos tienen una concentración que varía del 8 % p/p al 31 % p/p; y la fibra está presente en una concentración que varía del 69% p/p al 92% p/p, también denominada "composición instantánea" a lo largo de la especificación.

5 En otra realización de la presente descripción, la composición comprende aproximadamente del 0,1 % p/p a aproximadamente el 8 % p/p de Trigofoenósido, aproximadamente del 0,5 % p/p a aproximadamente el 5 % p/p de vitexina, aproximadamente del 0,5 % p/p a aproximadamente el 7 % p/p de iso-vitexina, aproximadamente del 0,5 % p/p a aproximadamente el 7 % p/p de vitexina-2-o-ramnósido, aproximadamente del 0,5 % p/p a aproximadamente el 4 % p/p de vicenina-1 y aproximadamente del 69 % p/p a aproximadamente el 92 % p/p de fibra.

10 En otra realización de la presente descripción, el excipiente farmacéuticamente aceptable está presente en una concentración que varía de aproximadamente el 10 % p/p a aproximadamente el 70 % p/p.

15 En otra realización de la presente descripción, el o los excipientes farmacéuticamente aceptables se seleccionan del grupo que comprende goma, agente granulador, aglutinante, lubricante, agente desintegrante, agente edulcorante, aditivo, disolvente, deslizante, antiadherente, agente antiestático, anti-oxidante, tensioactivo, potenciador de la viscosidad, material celulósico vegetal, agente colorante, agente aromatizante, agente de recubrimiento, plastificante, conservante, agente de suspensión, agente emulsionante y agente de esferonización o cualquier combinación de estos.

20 En una realización de la presente descripción, la composición se obtiene a partir de un material de origen biológico. En una realización ejemplar, la composición se obtiene a partir de una fuente vegetal, preferiblemente de fenogreco (*Trigonella foenum-graecum*).

En una realización no limitante de la presente descripción, la composición está en forma de un extracto vegetal, que incluye, pero no se limita a, extracto a base de fenogreco.

La presente descripción proporciona un método simple, rentable y eficiente para obtener una composición/extracto que comprende Trigofoenósido, Vitexina, Iso-vitexina, Vitexina-2-o-ramnósido, Vicenina-1 y Fibra.

25 En una realización no limitante, la composición/extracto se obtiene a partir de fenogreco (*Trigonella foenum-graecum*) y el método de preparación de la composición/extracto comprende en términos generales la acción de descamar semillas de fenogreco en un dispositivo generador de escamas para exponer el núcleo interno, lo que produce escamas de un tamaño promedio de 2 mm, de someter las semillas en escamas a una serie de etapas de extracción seguidas de acciones seleccionadas del grupo que comprende concentrar el extracto, dilución, adsorción, cromatografía, elución y concentración, o cualquier combinación de estos.

35 En una realización de la presente descripción, después de la descamación, las semillas de fenogreco se someten a extracción con un primer disolvente que es un compuesto alifático. En una realización ejemplar, el disolvente es n-alcano seleccionado del grupo que comprende n-hexano, n-pentano, n-heptano, preferiblemente n-hexano. Esta etapa se lleva a cabo a temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C, preferiblemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 27 °C, en un período de tiempo de aproximadamente 3,8 horas a aproximadamente 4,2 horas, preferiblemente de aproximadamente 4 horas y permite la eliminación de lípidos y aceites.

40 Después de la extracción con el primer disolvente, el extracto obtenido se trata con el segundo disolvente, acetato de etilo. Esta etapa se lleva a cabo a una temperatura que varía de aproximadamente 26 °C a aproximadamente 30 °C, preferiblemente de aproximadamente 27 °C a aproximadamente 29 °C y permite la eliminación de alcaloides y otras impurezas colorantes. A esto le sigue la nueva extracción con un tercer disolvente, n-butanol, en contracorriente a una temperatura que varía de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 27 °C, preferiblemente de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 25 °C, en un período de tiempo que varía de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 9 horas, preferiblemente de aproximadamente 8 horas. Luego, el extracto obtenido se concentra al vacío y se disuelve en agua desionizada y la solución transparente así obtenida se pasa a través de una resina adsorbente que se regenera y se lava con un disolvente seleccionado del grupo que comprende alcohol isopropílico, etanol y agua desionizada, o cualquier combinación de estos. La salida de la columna/resina se controla mediante cromatografía, preferiblemente cromatografía en capa fina. Una vez que toda la solución transparente ha pasado a través de la resina adsorbente, la resina/columna se lava con un disolvente seleccionado del grupo que comprende solución salina de cloruro de sodio y agua, o una combinación de estos, y se eluye usando un disolvente seleccionado del grupo que comprende etanol y alcohol isopropílico, preferiblemente alcohol isopropílico. Luego se recoge el eluido y se concentra para obtener la composición de la presente descripción. Opcionalmente, se pueden añadir excipientes a la composición final.

55 En otra realización no limitante de la presente descripción, el método de obtención de la composición comprende la adición secuencial y combinación de Trigofoenósido, Vitexina, Iso-vitexina, Vitexina-2-o-ramnósido, Vicenina-1 y Fibra, opcionalmente junto con excipientes farmacéuticamente aceptables para obtener la composición instantánea.

En una realización ejemplar, se añaden trigofoenósido, vitexina, iso-vitexina, vitexina-2-o-ramnósido, vicenina-1 de

modo que juntos constituyan aproximadamente del 8 % p/p a aproximadamente el 31 % p/p de la composición y la fibra se añade de manera que constituya aproximadamente del 69 % p/p a aproximadamente el 92 % p/p de la composición.

5 En otra realización ejemplar, el método comprende combinar aproximadamente del 0,1 % p/p a aproximadamente el 8 % p/p de trigofenósido, aproximadamente del 0,5 % p/p a aproximadamente el 5 % p/p de vitexina, aproximadamente del 0,5 % p/p a aproximadamente el 7 % p/p de iso-vitexina, aproximadamente del 0,5 % p/p a aproximadamente el 7 % p/p de vitexina-2-o-ramnósido, aproximadamente del 0,5 % p/p a aproximadamente el 4 % p/p de vicenina-1 y aproximadamente del 69 % p/p a aproximadamente el 92 % p/p de fibra, para obtener la composición.

10 En una realización alternativa de la presente descripción, la composición se puede obtener mediante síntesis química.

En una realización ejemplar, la composición de la presente descripción se usa para tratar enfermedades como hipoxia, hipertensión pulmonar, fibrosis pulmonar y sinusitis, o cualquier combinación de estas.

15 La presente descripción proporciona además la composición de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que comprende hipoxia, hipertensión pulmonar, fibrosis pulmonar y sinusitis, o cualquier combinación de estas, mediante la administración de la composición instantánea a un sujeto que lo necesite.

En una realización de la presente descripción, el término "controlar" o "control" incluye prevenir, tratar y curar una enfermedad o trastorno o efectos nocivos o secundarios. El término también abarca el mantenimiento del estado óptimo y la prevención de un progreso adicional de la enfermedad o trastorno o efectos nocivos o secundarios.

20 En otra realización de la presente descripción, el sujeto es un mamífero, incluidos los seres humanos.

En otra realización más de la presente descripción, la composición se formula en formas de dosificación seleccionadas del grupo que comprende formulación oral sólida, formulación oral líquida, formulación para inhalación, formulación nasal, formulación parenteral, fitocéticos, nutracéticos y productos alimenticios o cualquier combinación de estos. La formulación oral sólida se selecciona del grupo que comprende comprimidos, cápsulas, pastilla medicada, pastillas para chupar, polvo dispersable, gránulos dispersables o cualquier combinación de estos; la formulación oral líquida se selecciona del grupo que comprende suspensión acuosa u oleosa, emulsión, gotas, emulsión en cápsula de gel dura o blanda, jarabe, elixir o cualquier combinación de estos; la formulación parenteral se selecciona del grupo que comprende inyección intravenosa, inyección intramuscular, depósito intramuscular, inyección subcutánea, inyección percutánea o cualquier combinación de estos; la formulación para inhalación se selecciona del grupo que comprende inhalador, inhalador de polvo seco, nebulizador o cualquier combinación de estos; y la formulación nasal se selecciona del grupo que comprende gotas nasales, aerosoles nasales o una combinación de estos.

25 30

En una realización no limitante de la presente descripción, la administración de la composición se lleva a cabo por vía oral.

35 En otra realización más de la presente descripción, la composición instantánea se formula en una formulación de dosificación adecuada para obtener un efecto terapéutico. En una realización de la presente descripción, la dosis de la composición instantánea para sujetos se calcula de acuerdo con las directrices de la USFDA para la industria.

En una realización ejemplar, la composición se administra a una dosis que varía de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto, preferiblemente que varía de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal del sujeto.

40 En otra realización ejemplar, la composición se administra como un aerosol o inhalador a una dosis que varía de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal del sujeto, preferiblemente de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 25 µg/kg de peso corporal del sujeto.

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

Ejemplos

45 **Ejemplo 1(a):** Preparación de la composición instantánea a partir de Fenogreco

Se descaman 500 g de semillas de fenogreco hasta un espesor de aproximadamente 2 mm y luego se extraen con aproximadamente 3.000 ml de n-hexano a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 horas para eliminar los lípidos y aceites. El extracto se trata con aproximadamente 2.000 ml de acetato de etilo para eliminar los alcaloides y otras impurezas colorantes. Estas escamas de fenogreco extraídas se vuelven a extraer con aproximadamente 2.000 ml de n-butanol en contracorriente durante aproximadamente 8 horas. Este extracto transparente de n-butanol se concentra para obtener una masa sólida que pesa aproximadamente 6,5 g que luego se disuelve en 250 ml de agua desionizada para obtener una solución transparente. Luego se pasa esta solución a través de un lecho de resina adsorbente que contiene aproximadamente 25 ml de resina Amberlite xad-16 que se regenera y se lava con alcohol

50

isopropílico seguido de agua desionizada. La salida de la columna se controla para detectar la ausencia de compuestos usando cromatografía en capa fina con el siguiente sistema: cloroformo (aproximadamente 8 ml): metanol (aproximadamente 2 ml): aproximadamente 1 gota de agua. Una vez que se ha pasado toda la cantidad, la columna se lava con solución salina de cloruro de sodio al 0,9% seguido de aproximadamente 250 ml de agua. La columna se eluye con aproximadamente 250 ml de alcohol isopropílico, después de lo cual se recoge el eluido y se concentra para obtener un polvo marrón pálido que fluye libremente de aproximadamente 1,4 g, que es la composición instantánea que comprende Trigofenósido, Vitexina, Iso-vitexina, Vitexina-2-o-ramnósido, Vicenina-1 y fibra.

Además, para validar que el polvo comprende los componentes mencionados anteriormente, el polvo se analiza mediante HPLC y gravimetría.

Método HPLC

Nombre de la muestra: RD# FE 691

Vial: 1:A, 1

Inyección #: 1

Volumen de inyección: 20,00 µl

Duración: 10:00 minutos

Después de llevar a cabo la HPLC se obtienen cinco picos. El gráfico de HPLC de la composición instantánea se muestra en la Figura 1a. Se encuentra que los picos corresponden a los componentes activos, Trigofenósido, Vitexina, Iso-vitexina, Vitexina-2-o-ramnósido y Vicenina-1, al compararlos con los gráficos de HPLC de los estándares (Figuras 2a-2e).

Las concentraciones de los cinco componentes analizados mediante HPLC se calculan a partir del gráfico de HPLC usando un protocolo estándar y se proporcionan en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1: Concentración de componentes en la Composición Instantánea

N.º M.	Componente	Concentración (%)
1	Trigofenósido,	4,075
2	Vitexina,	3,415
3	Iso-vitexina,	2,800
4	Vitexina-2-o-ramnósido	3,369
5	Vicenina-1	1,554

Análisis gravimétrico

Protocolo

A aproximadamente 1 g del polvo obtenido se le añaden aproximadamente 40 ml de alcohol isopropílico (AIP) y se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. La solución se filtra, después de lo cual se obtiene un extracto de AIP transparente que se evapora hasta obtener un residuo en un baño de agua y se enfría a temperatura ambiente. Al residuo anterior se le añaden aproximadamente 100 ml de acetona y se agita durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Esta solución se filtra a través de papel de filtro Whatman (previamente pesado). El precipitado se seca a aproximadamente 100 °C durante aproximadamente 2 horas, después de lo cual se pesan nuevamente el precipitado y el papel de filtro.

Cálculo para determinar la concentración de Fibra:

Peso del precipitado = Peso del papel de filtro con precipitado – Peso del papel de filtro

Concentración de fibra soluble = [(Peso inicial de la muestra – Peso del precipitado) / Peso inicial de la muestra] X 100

En función de lo mismo, se determina que la concentración de fibra soluble obtenida es aproximadamente del 77%.

Ejemplo 1(b): Método para la preparación de la Composición Instantánea a partir de Fenogreco

Se descaman 500 g de semillas de fenogreco hasta un espesor de aproximadamente 2 mm y luego se extraen con aproximadamente 3.000 ml de n-heptano a temperatura ambiente durante aproximadamente 3,8 horas para eliminar los lípidos y aceites. El extracto se trata con aproximadamente 2.000 ml de acetato de etilo para eliminar los alcaloides

y otras impurezas colorantes. Estas escamas de fenogreco extraídas se vuelven a extraer con aproximadamente 2.000 ml de n-butanol en contracorriente durante aproximadamente 8 horas. Este extracto transparente de n-butanol se concentra para obtener una masa sólida que pesa aproximadamente 6,5 g que luego se disuelve en 250 ml de agua desionizada para obtener una solución transparente. Luego se pasa esta solución a través de un lecho de resina adsorbente que contiene aproximadamente 25 ml de resina Amberlite xad-16 que se regenera y se lava con etanol seguido de agua desionizada. La salida de la columna se controla para detectar la ausencia de compuestos usando cromatografía en capa fina con el siguiente sistema: cloroformo (aproximadamente 8 ml): metanol (aproximadamente 2 ml): aproximadamente 1 gota de agua. Una vez que se ha pasado toda la cantidad, la columna se lava con solución salina de cloruro de sodio al 0,9% seguido de aproximadamente 250 ml de agua. La columna se eluye con aproximadamente 250 ml de alcohol isopropílico, después de lo cual se recoge el eluido y se concentra para obtener un polvo marrón pálido que fluye libremente de aproximadamente 1,2 g, que es la composición instantánea que comprende Trigofenósido, Vitexina, Iso-vitexina, Vitexina-2-o-ramnósido, Vicenina-1 y fibra.

Método HPLC

Nombre de muestra: Lote vegetal IND 830

Vial: 1:A, 7

Inyección #: 1

Volumen de inyección: 20,00 µl

Duración: 10:00 minutos

Después de llevar a cabo la HPLC se obtienen cinco picos. El gráfico de HPLC de la composición instantánea se muestra en la Figura 1b. Se encuentra que los picos corresponden a los componentes activos, Trigofenósido, Vitexina, Iso-vitexina, Vitexina-2-o-ramnósido y Vicenina-1, al compararlos con los gráficos de HPLC de los estándares (Figuras 2a-2e).

Las concentraciones de los cinco componentes analizados mediante HPLC se calculan a partir del gráfico de HPLC usando el protocolo estándar y se proporcionan en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2: Concentración de componentes en la Composición Instantánea

N.º M.	Componente	Concentración (%)
1	Trigofenósido,	3,259
2	Vitexina,	1,300
3	Iso-vitexina,	2,094
4	Vitexina-2-o-ramnósido	2,022
5	Vicenina-1	0,679

Análisis gravimétrico

Protocolo

A aproximadamente 1 g del polvo obtenido se le añaden aproximadamente 40 ml de alcohol isopropílico (AIP) y se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. La solución se filtra, después de lo cual se obtiene un extracto de AIP transparente que se evapora hasta obtener un residuo en un baño de agua y se enfría a temperatura ambiente. Al residuo anterior se le añaden aproximadamente 100 ml de acetona y se agita durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Esta solución se filtra a través de papel de filtro Whatman (previamente pesado). El precipitado se seca a aproximadamente 100 °C durante aproximadamente 2 horas, después de lo cual se pesan nuevamente el precipitado y el papel de filtro.

Cálculo para determinar la concentración de Fibra:

Peso del precipitado = Peso del papel de filtro con precipitado - Peso del papel de filtro

Concentración de fibra soluble = [(Peso inicial de la muestra - Peso del precipitado)/ Peso inicial de la muestra] X 100

En función de lo mismo, se determina que la concentración de fibra soluble obtenida es aproximadamente del 79%.

Ejemplo 2: Método de preparación de la Composición Instantánea

Se añaden secuencialmente y se combinan aproximadamente del 0,1% p/p a aproximadamente el 8% p/p de

Trigofenósido, aproximadamente del 0,5% p/p a aproximadamente el 5% p/p de Vitexina, aproximadamente del 0,5% p/p a aproximadamente el 7% p/p de Iso-vitexina, aproximadamente del 0,5% p/p a aproximadamente el 7% p/p de Vitexina-2-o-ramnósido, y aproximadamente del 0,5% p/p a aproximadamente el 4% p/p de Vicenina-1, después de lo cual se añade aproximadamente desde un 69 % p/p hasta aproximadamente un 92 % p/p de fibra a la combinación, opcionalmente junto con excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s), para obtener la composición instantánea.

Ejemplo 3: Evaluación de la Composición Instantánea sobre la hipoxia, la hipertensión pulmonar, la fibrosis pulmonar y la sinusitis

La hipertensión pulmonar (HAP) se induce en ratas Sprague Dawley macho que pesan aproximadamente 200-220 g a través de la administración subcutánea de monocrotalina (MCT) (60 mg/kg) bajo anestesia. Los animales a los que se administró monocrotalina (MCT) se tratan con vehículo (10 mg/kg de agua destilada, p.o.) o composición instantánea (10 mg/kg, 20 mg/kg y 40 mg/kg, p.o.) durante 28 días. Los parámetros necesarios se evalúan en varios días.

Modelo animal:

La hipertensión de la arteria pulmonar (HAP) se caracteriza por la remodelación de las arterias pulmonares con proliferación endotelial, hiperplasia e hipertrofia del músculo liso y expansión de la matriz adventicia. Un aumento de la presión arterial pulmonar, hipertrofia del ventrículo derecho y cor pulmonale final son manifestaciones de una fisiopatología compleja que compone esta enfermedad. Un modelo que se usa con frecuencia para el estudio de los cambios funcionales, estructurales y moleculares asociados con la hipertrofia compensada ventricular derecha (VD) y la insuficiencia VD es el tratamiento de ratas con monocrotalina (MCT). Es una fitotoxina derivada de las semillas de *Crotalaria spectabilis* y se activa in vivo mediante oxidasas de función mixta en el hígado para formar el compuesto de entrecruzamiento bifuncional reactivo pirrol MCT. La MCT exhibe un efecto tóxico selectivo sobre los vasos pulmonares sin tener ningún efecto sobre los vasos sistémicos ya que los pulmones representan el primer lecho vascular importante distal al hígado.

Ejemplo 3.1: Evaluación de la Composición Instantánea en la Hipoxia

La composición instantánea obtenida en el ejemplo 1(a) se usa en los siguientes experimentos.

La evaluación de la hipoxia se lleva a cabo usando los siguientes parámetros:

a. Contenido de oxígeno en sangre periférica

b. Mediciones de la función pulmonar

i. Frecuencia respiratoria

ii. Pausa mejorada

Efecto de la composición instantánea sobre la alteración inducida por MCT en el contenido de oxígeno en sangre periférica (pulso Ox) de ratas:

La oximetría de pulso es particularmente conveniente para la medición continua no invasiva de la saturación de oxígeno en sangre. Un monitor de oxígeno en sangre muestra el porcentaje de sangre cargada de oxígeno. Más concretamente, mide qué porcentaje de hemoglobina, la proteína de la sangre que transporta el oxígeno, está cargada.

Los datos se analizan mediante ANOVA de una vía seguido de las pruebas posteriores de Dunnett. $^{###}P < 0,001$ en comparación con el grupo normal, y $^{**}P < 0,01$, $^{***}P < 0,001$ en comparación con el grupo de control MCT. Los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación y en la Figura 3 (resultado del día 28).

Tabla 3: Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por MCT en el contenido de oxígeno en sangre periférica (pulso Ox)

	Normal	Control de MCT	Composición Instantánea C1(10) (10 mg/kg)	Composición Instantánea C1(20) (20 mg/kg)	Composición Instantánea C1(40) (40 mg/kg)
Pulso Ox (% de saturación O ₂)	94,43 ± 0,57	90,57 ± 0,36 ^{###}	91,57 ± 0,75	93,57 ± 0,57 ^{**}	93,57 ± 0,36 ^{**}

Como se puede observar, el contenido de oxígeno en sangre periférica disminuye significativamente ($P < 0,001$) en el grupo de control MCT en comparación con el grupo normal el día 28. El tratamiento con la Composición Instantánea, particularmente a concentraciones de 20 mg/kg y 40 mg/kg, produce aumento significativo ($P < 0,01$) en el contenido de oxígeno en sangre periférica en comparación con las ratas de control MCT que alcanzaron el nivel normal.

Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por MCT en la frecuencia respiratoria (f) de ratas:

Los datos se analizan mediante ANOVA de dos vías seguido de las pruebas posteriores de Bonferroni. $^{*}P < 0,05$, $^{**}P < 0,01$ en comparación con el grupo normal, y $^{*}P < 0,05$ en comparación con el grupo de control MCT en los días respectivos, y los resultados se muestran en la Tabla 4 a continuación, así como en la Figura 4.

5 Tabla 4: Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por MCT en la frecuencia respiratoria (f) de ratas

Tiempo (en días)	Normal	Control de MCT	Composición Instantánea C1(10) (10 mg/kg)	Composición Instantánea C1(20) (20 mg/kg)	Composición Instantánea C1(40) (40 mg/kg)
0	222,67 ± 8,27	219,11 ± 11,92	222,30 ± 13,59	224,94 ± 8,63	235,67 ± 8,09
14	222,07 ± 9,59	182,71 ± 11,26 [#]	205,19 ± 13,32	196,93 ± 10,15	183,33 ± 10,32
28	224,04 ± 16,78	170,37 ± 11,25 ^{##}	200,86 ± 10,77	214,93 ± 8,90 [*]	215,56 ± 6,05 [*]

10 Se puede observar que no hay una diferencia significativa en la frecuencia respiratoria del grupo de control MCT ni en la del grupo normal el día 0. La frecuencia respiratoria disminuye significativamente ($P < 0,05$ y $P < 0,01$) en las ratas de control de MCT después de 14 días y 28 días de administración subcutánea de MCT en comparación con el grupo normal. En comparación con el grupo de control MCT, esta frecuencia respiratoria aumenta significativamente ($P < 0,05$) en el grupo de tratamiento de la composición instantánea (20 mg/kg y 40 mg/kg) después de 28 días de tratamiento.

Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por MCT en pausa mejorada (P_{mej}) de ratas:

15 La P_{mej} es un índice adimensional que normalmente se usa para evaluar los cambios en la forma del patrón de flujo de aire que entra y sale de un pletismógrafo de flujo del cuerpo entero cuando un animal respira. El índice es sensible a los cambios en la distribución del área bajo la onda durante la exhalación y aumenta de forma no lineal a medida que el área normalizada aumenta cerca del comienzo de la curva.

20 Los datos se analizan mediante ANOVA de dos vías seguido de las pruebas posteriores de Bonferroni. $^{##}P < 0,01$ en comparación con el grupo normal, y $^{*}P < 0,05$, $^{**}P < 0,01$ en comparación con el grupo de control MCT en los días respectivos, y los resultados se muestran en la Tabla 5 a continuación, así como en la Figura 5.

Tabla 5: Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por MCT en pausa mejorada (P_{mej}) de ratas

Tiempo (en días)	Normal	Control de MCT	Composición Instantánea C1(10) (10 mg/kg)	Composición Instantánea C1(20) (20 mg/kg)	Composición Instantánea C1(40) (40 mg/kg)
0	0,89 ± 0,04	0,90 ± 0,04	0,93 ± 0,07	0,95 ± 0,08	0,96 ± 0,05
14	0,97 ± 0,12	1,28 ± 0,14	1,08 ± 0,21	1,15 ± 0,16	1,21 ± 0,19
28	0,89 ± 0,05	1,48 ± 0,18 ^{##}	1,22 ± 0,09	0,97 ± 0,20 [*]	0,93 ± 0,08 ^{**}

25 Como se puede observar, no hay diferencias significativas en la pausa mejorada del grupo de control de MCT, así como en el grupo normal y en el grupo tratado con Composición Instantánea (10 mg/kg, 20 mg/kg y 40 mg/kg) el día 0. La pausa mejorada aumenta significativamente ($P < 0,01$) en las ratas de control de MCT después de 28 días de administración subcutánea de MCT en comparación con el grupo normal. En comparación con el grupo de control de MCT, esta pausa mejorada disminuye significativamente y de manera dependiente de la dosis ($P < 0,05$ y $P < 0,01$) en el grupo de tratamiento de la Composición Instantánea (20 mg/kg y 40 mg/kg) después de 28 días.

Conclusión:

A partir de los resultados anteriores, queda claro que la Composición Instantánea normaliza eficazmente la saturación de oxígeno en sangre, lo que da como resultado la restauración del porcentaje de hemoglobina que transporta oxígeno

a través de la sangre. La normalización de la frecuencia respiratoria es indicativa de un suministro adecuado de oxígeno por parte de la Composición Instantánea. También normaliza los cambios en la forma del patrón del flujo de aire que entra y sale de un flujo de todo el cuerpo en caso de niveles bajos de oxígeno. Por lo tanto, todos los hallazgos anteriores demuestran que la Composición Instantánea es un fármaco seguro y eficaz para la hipoxia.

5 **Ejemplo 3.2:** Efecto de la Composición Instantánea sobre la hipertensión pulmonar usando mediciones hemodinámicas

La Composición Instantánea obtenida en el Ejemplo 1(a) se usa en los siguientes experimentos.

10 Las mediciones hemodinámicas incluyen muchos parámetros como $dP/dt_{\text{máx}}$, $dP/dt_{\text{mín.}}$, índice de contractilidad y tau. Estos parámetros ayudan a detallar las presiones del flujo de aire, como la relación entre la presión sistólica y la presión diastólica a lo largo del tiempo. También profundizan en la caída de presión y su análisis, a través de la constante de tiempo (tau) que permite describir el curso de la relajación miocárdica.

15 El rendimiento sistólico se evalúa mediante el índice de contractilidad de $dP/dt_{\text{máx}}$ mientras que la disfunción diastólica se provoca en respuesta al aumento de la poscarga. La diástole se evalúa con la constante de tiempo de la relajación isovolumétrica (tau) y la relación presión-diámetro telediastólica (EDPDR); la primera evalúa la relajación activa mientras que la segunda es una estimación in vivo de la rigidez del miocardio. El proceso dinámico de relajación miocárdica continúa desde la fase de eyección hasta el período de llenado temprano.

Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por MCT en la $dP/dt_{\text{máx}}$ ventricular derecha y la $dP/dt_{\text{mín.}}$ ventricular derecha de ratas:

20 Los datos se analizan mediante ANOVA de una vía seguido de las pruebas posteriores de Dunnett. $^{***}P < 0,01$, $^{****}P < 0,001$ en comparación con el grupo normal, y $^{*}P < 0,05$, $^{**}P < 0,01$, $^{***}P < 0,001$ en comparación con el grupo de control MCT en los días respectivos. Los resultados se muestran en la Tabla 6 a continuación y en las Figuras 6a y 6b.

Tabla 6: Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por MCT en la $dP/dt_{\text{máx}}$ ventricular derecha y la $dP/dt_{\text{mín.}}$ ventricular derecha de ratas

	Normal	Control de MCT	Composición Instantánea C1(10) (10 mg/kg)	Composición Instantánea C1(20) (20 mg/kg)	Composición Instantánea C1(40) (40 mg/kg)
$dP/dt_{\text{máx}}$ (mmHg)	982,3 ± 46,15	1.376,00 ± 94,80 ^{###}	1.254,00 ± 66,92	1.090,00 ± 55,16 [*]	1.042,00 ± 65,86 ^{**}
$dP/dt_{\text{mín.}}$ (mmHg)	-746,6 ± 76,15	-1.356,00 ± 66,02 ^{###}	-1.105,00 ± 39,62 [*]	-1.041,00 ± 33,43 ^{**}	-1.021,00 ± 46,38 ^{***}

25 Como se puede observar, hay un aumento significativo ($P < 0,01$ y $P < 0,001$) en la $dP/dt_{\text{máx}}$, así como en la $dP/dt_{\text{mín.}}$ en el grupo de control de MCT en comparación con el grupo normal después de 28 días de administración subcutánea de MCT. La administración de la composición instantánea (20 mg/kg y 40 mg/kg) disminuye la $dP/dt_{\text{máx}}$ significativamente y de forma dependiente de la dosis ($P < 0,05$ y $P < 0,01$) en comparación con el grupo de control MCT, mientras que la administración de la composición instantánea en las tres dosis disminuye la $dP/dt_{\text{mín.}}$ significativamente y de manera dependiente de la dosis ($P < 0,05$, $P < 0,01$ y $P < 0,001$, reps.) en comparación con el grupo de control MCT.

Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por MCT en el índice de contractilidad y tau de ratas:

35 Los datos se analizan mediante ANOVA de una vía seguido de las pruebas posteriores de Dunnett. $^{***}P < 0,001$ en comparación con el grupo normal, y $^{*}P < 0,05$, $^{***}P < 0,001$ en comparación con el grupo de control MCT el día 28. Los resultados se muestran en la Tabla 7 a continuación y en las Figuras 7a y 7b.

Tabla 7: Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por MCT en el índice de contractilidad y tau de ratas

	Normal	Control de MCT	Composición Instantánea C1(10) (10 mg/ml)	Composición Instantánea C1(20) (20 mg/ml)	Composición Instantánea C1(40) (40 mg/ml)
Índice de contractilidad	17,71 ± 0,91	8,28 ± 0,77 ^{###}	9,28 ± 0,42	11,57 ± 0,52 [*]	13,71 ± 0,71 ^{***}
Tau (ms)	14,71 ± 1,12	26,14 ± 1,10 ^{###}	25,00 ± 0,97	21,29 ± 0,86 [*]	18,57 ± 0,89 ^{***}

Como se puede observar, hay una disminución significativa ($P < 0,001$) en el índice de contractilidad y un aumento significativo ($P < 0,001$) en tau en el grupo de control MCT en comparación con el grupo normal. La administración de la composición instantánea (20 mg/kg y 40 mg/kg) normaliza significativamente y de forma dependiente de la dosis ($P < 0,05$ y $P < 0,001$) el índice de contractilidad en comparación con el grupo de control MCT, mientras que el tratamiento con la composición instantánea (20 mg/kg y 40 mg/kg) el día 28 produce una restauración significativa y dependiente de la dosis ($P < 0,05$ y $P < 0,001$) en tau en comparación con el grupo de control MCT.

Conclusión: La Composición Instantánea normaliza eficazmente las presiones sistólica y diastólica finales y ayuda a restaurar los índices de contractilidad y tau mostrando su actividad altamente significativa en la hipertensión pulmonar.

10 **Ejemplo 3.3:** Evaluación de la Composición Instantánea en la fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina

La Composición Instantánea obtenida en el Ejemplo 1(b) se usa en los siguientes experimentos.

La evaluación de la Composición Instantánea en la fibrosis pulmonar [FP] inducida por bleomicina se lleva a cabo usando los siguientes parámetros:

a. Mediciones de la función pulmonar.

i. Tiempo inspiratorio

ii. Tiempo espiratorio

iii. Pausa mejorada (P_{mej})

b. Contenido de oxígeno en sangre periférica

Protocolo:

La FP se induce en ratas macho Sprague Dawley (180-220 g) mediante la administración intratraqueal de Bleomicina (BLM) (6 UI/kg) bajo anestesia con ketamina. Los animales a los que se les administró Bleomicina se trataron con vehículo (10 mg/kg de agua destilada, p.o.) o con Composición Instantánea (10 mg/kg, 20 mg/kg y 40 mg/kg, p.o.) durante 28 días. El grupo simulado comprende animales sometidos a la administración intratraqueal de vehículo (10 mg/kg de agua destilada, p.o.) bajo anestesia con ketamina. Los parámetros necesarios se evalúan en varios días. Se encuentra que los niveles alterados de la prueba de función pulmonar y de la hematología son significativamente ($P < 0,01$ y $P < 0,001$) restaurados por el tratamiento con la Composición Instantánea (20 mg/kg y 40 mg/kg, p.o.).

Modelo animal:

El paradigma de fibrosis pulmonar de roedores y la bleomicina es un modelo sustituto establecido y ampliamente usado de fibrosis pulmonar humana. Uno de los mecanismos ampliamente aceptados de lesión pulmonar inducida por bleomicina es su capacidad para generar ROS. Se sabe que la bleomicina se une al ADN/Fe²⁺ y forma un complejo. Este complejo ADN/Fe²⁺/bleomicina sufre un ciclo redox y genera ROS como superóxido y radicales hidroxilos, lo que da como resultado el inicio de la fibrosis.

Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en el tiempo inspiratorio (T_i) de ratas:

Los datos se analizan mediante ANOVA de dos vías seguido de las pruebas posteriores de Bonferroni. $^{##}P < 0,01$, $^{###}P < 0,001$ en comparación con el grupo normal, $^{$$}P < 0,01$, $^{$$$}P < 0,001$ en comparación con el grupo simulado, y $^{*}P < 0,05$, $^{**}P < 0,01$, $^{***}P < 0,001$ en comparación con el grupo de control BLM en los días respectivos. Los resultados se muestran en la Tabla 8 a continuación y en la Figura 8.

Tabla 8: Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en el tiempo inspiratorio (T_i) de ratas

Tiempo (días)	Normal	Simulado	Control BLM	Composición Instantánea C1(10) (10 mg/kg)	Composición Instantánea C1(20) (20 mg/kg)	Composición Instantánea C1(40) (40 mg/kg)
0	165,89 ± 14,77	152,02 ± 6,59	167,04 ± 8,98	130,65 ± 7,30	149,60 ± 9,69	137,16 ± 11,42
7	157,52 ± 16,55	166,34 ± 15,32	243,87 ± 11,30 ^{##,\$\$}	238,76 ± 14,36	231,27 ± 27,47	226,60 ± 21,74
14	168,70 ± 16,85	185,31 ± 13,52	277,20 ± 33,03 ^{##,\$\$\$}	243,56 ± 28,10	220,63 ± 30,96	278,12 ± 11,08

Tiempo (días)	Normal	Simulado	Control BLM	Composición Instantánea C1(10) (10 mg/kg)	Composición Instantánea C1(20) (20 mg/kg)	Composición Instantánea C1(40) (40 mg/kg)
21	161,75 ± 5,49	166,92 ± 7,63	302,64 ± 22,99###,\$\$\$	265,76 ± 7,34	234,43 ± 16,95	257,66 ± 17,99*
28	161,35 ± 12,37	169,21 ± 9,59	310,38 ± 24,17###,\$\$\$	241,26 ± 20,53**	220,75 ± 6,74**	220,87 ± 8,09**

Como se puede observar, no hay una diferencia significativa en el tiempo inspiratorio del grupo de control BLM en comparación con el grupo normal y simulado el día 0. La instilación intratraqueal de BLM aumenta significativamente ($P < 0,001$) el tiempo inspiratorio de las ratas de control BLM en comparación con el grupo normal y simulado desde el día 7 en adelante. El tratamiento en el día 28 con la Composición Instantánea (10 mg/kg, 20 mg/kg y 40 mg/kg) disminuye significativamente ($P < 0,01$) el tiempo inspiratorio en comparación con las ratas de control BLM el día 28.

Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en el tiempo espiratorio (T_e) de ratas:

Los datos se analizan mediante ANOVA de dos vías seguido de las pruebas posteriores de Bonferroni. ### $P < 0,001$ en comparación con el grupo normal, \$\$\$ $P < 0,001$ en comparación con el grupo simulado, y * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ en comparación con el grupo de control BLM en los días respectivos. Los resultados se muestran en la Tabla 9 a continuación y en la Figura 9.

Tabla 9: Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en el tiempo espiratorio (T_e) de ratas

Tiempo (días)	Normal	Simulado	Control BLM	Composición Instantánea C1(10) (10 mg/kg)	Composición Instantánea C1(20) (20 mg/kg)	Composición Instantánea C1(40) (40 mg/kg)
0	202,57 ± 8,37	211,18 ± 12,50	242,41 ± 21,77	219,70 ± 16,18	199,82 ± 14,83	204,33 ± 28,00
7	219,74 ± 21,55	223,35 ± 18,16	95,17 ± 15,14###,\$\$\$	89,27 ± 6,75	104,56 ± 19,25	105,34 ± 10,25
14	188,33 ± 22,88	213,13 ± 5,44	95,10 ± 9,77###,\$\$\$	112,00 ± 11,25	123,26 ± 37,88	115,38 ± 7,21
21	198,96 ± 15,80	227,40 ± 18,94	62,87 ± 13,15###,\$\$\$	122,97 ± 18,00*	127,23 ± 15,92*	143,64 ± 17,06**
28	203,94 ± 6,11	195,54 ± 10,60	62,42 ± 10,09###,\$\$\$	142,87 ± 15,50**	132,85 ± 17,11*	170,43 ± 12,19***

Como se puede observar, el tiempo espiratorio no difiere significativamente en el grupo de control BLM ni en el grupo normal y simulado el día 0. Sin embargo, hay una disminución significativa ($P < 0,001$) en el tiempo espiratorio de ratas de control BLM después de 7 días de instilación intratraqueal de BLM en comparación con el grupo normal y simulado. Esta disminución del tiempo espiratorio aumenta significativamente ($P < 0,05$, $P < 0,01$ y $P < 0,001$) en el tratamiento del día 28 con la Composición Instantánea (10, 20 y 40 mg/kg) en comparación con las ratas de control BLM.

Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en la pausa mejorada (P_{mej}) de ratas:

Los datos se analizan mediante ANOVA de dos vías seguido de las pruebas posteriores de Bonferroni. ### $P < 0,001$ en comparación con el grupo normal, \$\$\$ $P < 0,001$ en comparación con el grupo simulado, y *** $P < 0,001$ en comparación con el grupo de control BLM en los días respectivos. Los resultados se muestran en la Tabla 10 a continuación y en la Figura 10.

Tabla 10: Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en la pausa mejorada (P_{mej}) de ratas

Tiempo (días)	Normal	Simulado	Control BLM	Composición Instantánea C1(10) (10 mg/kg)	Composición Instantánea C1(20) (20 mg/kg)	Composición Instantánea C1(40) (40 mg/kg)
0	0,81 ± 0,04	0,80 ± 0,04	0,97 ± 0,11	0,82 ± 0,07	0,77 ± 0,04	0,75 ± 0,04
7	1,0 ± 0,19	1,03 ± 0,18	1,28 ± 0,11	1,15 ± 0,15	1,00 ± 0,19	1,42 ± 0,08
14	0,93 ± 0,16	0,88 ± 0,07	1,36 ± 0,12	1,38 ± 0,22	1,42 ± 0,03	1,09 ± 0,19
21	1,02 ± 0,14	0,85 ± 0,09	1,80 ± 0,25###,\$\$\$	1,97 ± 0,11	1,46 ± 0,29	1,41 ± 0,14
28	1,04 ± 0,05	1,15 ± 0,04	2,71 ± 0,19###,\$\$\$	1,82 ± 0,22***	1,74 ± 0,04***	1,64 ± 0,10***

5 Como se puede observar, no hay diferencias significativas en la pausa mejorada del grupo de control BLM ni en el grupo normal y simulado los días 0, 7 y 14. La pausa mejorada aumenta significativamente ($P < 0,001$) en las ratas de control BLM después de 21 días de instilación intratraqueal de BLM en comparación con el grupo normal y simulado. En comparación con el grupo de control BLM, esta pausa mejorada se normaliza significativamente ($P < 0,001$) en la Composición Instantánea (10 mg/kg, 20 mg/kg y 40 mg/kg) después de 28 días.

10 Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en el contenido de oxígeno en sangre periférica (pulso Ox) de ratas:

Los datos se analizan mediante ANOVA de dos vías seguido de las pruebas posteriores de Bonferroni. * $P < 0,05$, ### $P < 0,001$ en comparación con el grupo normal, \$ $P < 0,05$, \$\$\$ $P < 0,001$ en comparación con el grupo simulado, y * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ en comparación con el grupo de control BLM en los días respectivos. Los resultados se tabulan en la Tabla 11 a continuación y en la Figura 11.

15 Tabla 11: Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en el contenido de oxígeno en sangre periférica (pulso Ox) de ratas

Tiempo (días)	Normal	Simulado	Control BLM	Composición Instantánea C1(10) (10 mg/ml)	Composición Instantánea C1(20) (20 mg/ml)	Composición Instantánea C1(40) (40 mg/ml)
14	95,75 ± 0,47	95,25 ± 0,62	91,50 ± 0,64#,\$	92,50 ± 1,32	94,25 ± 0,47	92,00 ± 1,35
28	96,00 ± 0,40	95,00 ± 0,70	87,75 ± 1,31###,\$\$\$	92,00 ± 1,47*	93,00 ± 1,08**	92,75 ± 1,10**

20 Como se puede observar, el contenido de oxígeno en sangre periférica disminuye significativamente ($P < 0,05$ y $P < 0,001$) en el grupo de control BLM en comparación con el grupo normal y simulado los días 14 y 28 respectivamente. El tratamiento con la Composición Instantánea (10 mg/kg, 20 mg/kg y 40 mg/kg) no produce ningún aumento significativo en el contenido de oxígeno en sangre periférica el día 14 en comparación con las ratas de control BLM. Sin embargo, la administración el día 28 de la Composición Instantánea (10 mg/kg, 20 mg/kg y 40 mg/kg) inhibe y restaura significativamente y de forma dependiente de la dosis ($P < 0,05$, $P < 0,01$ y $P < 0,01$) la disminución inducida por BLM en el contenido de oxígeno en sangre periférica en comparación con las ratas de control BLM el día 28.

25 Conclusión: La restauración de las pruebas de función pulmonar tales como el tiempo inspiratorio, el tiempo espiratorio y la normalización del contenido de oxígeno en sangre y la pausa mejorada mediante la Composición Instantánea demuestra su eficacia en el tratamiento de la fibrosis pulmonar.

Ejemplo 3.4: Evaluación de la Composición Instantánea en la sinusitis inducida por Bleomicina

La Composición Instantánea obtenida en el Ejemplo 1(b) se usa en los siguientes experimentos.

30 La evaluación de la Composición Instantánea en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina se lleva a cabo usando los siguientes parámetros:

a. Análisis RT-PCR de genes en pulmón.

i. Muc5ac

ii. NF-kB

Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en la expresión del ARNm de Muc5ac en pulmones de ratas:

Se considera que Muc5ac es una mucina principal secretada por las células caliciformes del epitelio superficial. La sobreproducción de moco representa un componente del mal funcionamiento mucociliar en los trastornos respiratorios y Muc5ac se expresa de manera prominente en el epitelio de las vías respiratorias en estos trastornos. Se ha demostrado que el estrés oxidativo, generado en respuesta a la bleomicina, aumenta la producción de Muc5ac en las células epiteliales bronquiales, un proceso que puede implicar una activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico. Aquí, en la presente investigación, la bleomicina aumenta el ARNm pulmonar de Muc5ac y aumenta las células formadoras de moco de la capa epitelial de las vías respiratorias. Se ha descubierto que la Composición Instantánea reduce de forma dependiente de la dosis la formación de Muc5ac pulmonar inducida por bleomicina y las células formadoras de moco epitelial.

Los datos se analizan mediante ANOVA de una vía seguido de las pruebas posteriores de Dunnett. $###P < 0,001$ en comparación con el grupo normal, $$$$P < 0,001$ en comparación con el grupo simulado, y $*P < 0,05$, $***P < 0,001$ en comparación con el grupo de control BLM el día 28. Los resultados se tabulan en la Tabla 12 a continuación y en la Figura 12.

Tabla 12: Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en la expresión del ARNm de Muc5ac en pulmón de ratas

	Normal	Simulado	Control BLM	Composición Instantánea C1(10) (10 mg/kg)	Composición Instantánea C1(20) (20 mg/kg)	Composición Instantánea C1(40) (40 mg/kg)
Muc5ac/ β -actina	$0,36 \pm 0,04$	$0,48 \pm 0,09$	$2,17 \pm 0,21^{###, $$$}$	$1,41 \pm 0,13^*$	$1,04 \pm 0,17^{***}$	$0,63 \pm 0,08^{***}$

Como se puede observar, la expresión del ARNm de Muc5ac está regulada al alza de manera significativa ($P < 0,001$) en las ratas de control BLM en comparación con el grupo normal y simulado el día 28. El tratamiento del día 28 con la Composición Instantánea (10 mg/kg, 20 mg/kg y 40 mg/kg) regula a la baja de manera significativa y dependiente de la dosis ($P < 0,05$, $P < 0,001$ y $P < 0,001$) el ARNm de Muc5ac en pulmones en comparación con ratas de control BLM.

Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en la expresión del ARNm de NF-kB en pulmones de ratas:

Otra diana de las ROS generadas por la bleomicina es la activación de NF-kB, un factor de transcripción que regula muchos genes de citoquinas, incluidos los examinados en este estudio, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8. El TNF- α y la IL-1 β pueden a su vez activar también el NF-kB. La bleomicina activa la actividad de NF-kB en los pulmones, lo que sugiere que las células epiteliales pulmonares secretan NF-kB p65 (Chitra y cols., 2013). En el presente estudio, se descubre que el tratamiento con la Composición Instantánea ejerce sus efectos a través de su potencial antioxidante que inhibe la activación de NF-kB inducida por oxidantes, ejerciendo así el efecto anti-fibrótico en el modelo de fibrosis pulmonar con bleomicina.

Los datos se analizan mediante ANOVA de una vía seguido de las pruebas posteriores de Dunnett. $##P < 0,01$, $###P < 0,001$ en comparación con el grupo normal, $$$P < 0,01$, $$$$P < 0,001$ en comparación con el grupo simulado, y $*P < 0,05$, $***P < 0,001$ en comparación con el grupo de control BLM el día 28. Los resultados se muestran en la Tabla 13 a continuación y en la Figura 13.

Tabla 13: Efecto de la Composición Instantánea sobre la alteración inducida por bleomicina en la expresión del ARNm de NF-kB en pulmón de ratas

	Normal	Simulado	Control BLM	Composición Instantánea C1(10) (10 mg/kg)	Composición Instantánea C1(20) (20 mg/kg)	Composición Instantánea C1(40) (40 mg/kg)
NF-kB/ β -actina	$1,04 \pm 0,65$	$0,67 \pm 0,12$	$2,99 \pm 0,21^{###, $$$}$	$1,72 \pm 0,14^*$	$0,95 \pm 0,28^{***}$	$0,97 \pm 0,16^{***}$

Como se puede observar, existe una regulación al alza significativa ($P < 0,001$ y $P < 0,01$) en la expresión de ARNm de NF-kB de pulmón del grupo de control BLM en comparación con el grupo normal y simulado el día 28. Sin embargo, el tratamiento con la Composición Instantánea (10 mg/kg, 20 mg/kg y 40 mg/kg) significativamente y regula a la baja ($P < 0,05$, $P < 0,001$ y $P < 0,001$) la expresión de ARNm de NF-kB pulmonar regulada al alza inducida por BLM en comparación con las ratas de control BLM.

Conclusión: Los genes formadores de moco (Muc5ac, NF-kB) activan la sinusitis en las vías respiratorias del tracto respiratorio superior. La regulación a la baja dependiente de la dosis de estos genes muestra la eficacia de la Composición Instantánea en el tratamiento de la sinusitis.

Por tanto, los ejemplos de la presente descripción muestran la eficacia de la Composición Instantánea en el tratamiento de enfermedades tales como la hipoxia, la hipertensión pulmonar, la fibrosis pulmonar y la sinusitis.

Las realizaciones y características adicionales de la presente descripción son evidentes para un experto en la técnica en función de la descripción proporcionada en la presente memoria. Las realizaciones de la presente memoria proporcionan diversas características y detalles ventajosos de estas en la descripción. Se omiten las descripciones de métodos y técnicas bien conocidos/convencionales para no oscurecer innecesariamente las realizaciones de la presente memoria. La descripción anterior de las realizaciones específicas revela completamente la naturaleza general de las realizaciones en la presente memoria que otros pueden, aplicando el conocimiento actual, modificar y/o adaptar fácilmente diversas aplicaciones como realizaciones específicas sin apartarse del concepto genérico y, por lo tanto, dichas adaptaciones y modificaciones deben y están destinadas a ser entendidas dentro del significado y rango de equivalentes de las realizaciones descritas. A lo largo de esta especificación, se entenderá que la palabra "comprende", o variaciones como "comprende" o "que comprende" dondequiera que se use, implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa indicada, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero sin la exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas. Con respecto al uso de sustancialmente cualquier término plural y/o singular en la presente memoria, aquellos con experiencia en la técnica pueden traducir del plural al singular y/o del singular al plural según sea apropiado para el contexto y/o la aplicación. Las diversas permutaciones singulares/plurales se pueden establecer expresamente en la presente memoria en aras de la claridad. El uso de la expresión "al menos" o "al menos uno" sugiere el uso de uno o más elementos o ingredientes o cantidades, según pueda ser el uso en la realización de la descripción para lograr uno o más de los objetivos o resultados deseados. Cualquier discusión sobre documentos, acciones, materiales, dispositivos, artículos y similares que se hayan incluido en esta especificación tiene únicamente el propósito de proporcionar un contexto para la descripción. No se debe considerar como una admisión de que alguno o todos estos asuntos forman parte de la base de la técnica anterior o fueran de conocimiento general común en el campo relevante para la descripción tal como existía en cualquier lugar antes de la fecha de prioridad de esta solicitud.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende Trigofoenósido, Vitexina, Iso-vitexina, Vitexina-2-o-ramnósido, Vicenina-1 y fibra, opcionalmente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable; en donde el Trigofoenósido, la Vitexina, la Iso-vitexina, la Vitexina-2-o-ramnósido y la Vicenina-1 tienen juntos una concentración que varía del 8 % p/p al 31 %; y la fibra está presente en una concentración que varía del 69 % p/p al 92% p/p.
2. Un método para obtener una composición según se reivindica en la reivindicación 1, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - a) extraer el material fuente en escamas de la composición con un primer disolvente a una temperatura que varía de 25 °C a 30 °C durante un periodo de tiempo de 3,8 horas a 4,2 horas para obtener el primer material fuente en escamas extraído, en donde el material fuente es *Trigonella foenum graecum*, y en donde dicho primer disolvente es un compuesto alifático seleccionado del grupo que comprende n-hexano, n-pentano y n-heptano;
 - b) tratar el primer material fuente en escamas extraído con acetato de etilo a una temperatura que varía de 26 °C a 30 °C para obtener el segundo material fuente en escamas extraído;
 - c) volver a extraer el segundo material fuente en escamas extraído con n-butanol a una temperatura que varía de 22 °C a 27 °C durante un periodo de tiempo que varía de 7 horas a 9 horas para obtener un extracto transparente;
 - d) concentrar el extracto transparente para obtener masa sólida;
 - e) disolver la masa sólida en agua desionizada para obtener una solución transparente;
 - f) regenerar y lavar el adsorbente con disolvente para obtener adsorbente regenerado y lavado;
 - g) pasar la solución transparente a través del adsorbente regenerado y lavado, volver a lavar el adsorbente con disolvente y eluir con un disolvente alcohólico para obtener un eluido; y
 - h) concentrar el eluido y opcionalmente añadir un excipiente farmacéuticamente aceptable para obtener la composición.
3. El método según se reivindica en la reivindicación 2, en donde la etapa de extracción con el primer disolvente se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura que varía de 25 °C a 27 °C, durante un periodo de tiempo de 4 horas; en donde la etapa de tratamiento con acetato de etilo se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura que varía de 27 °C a 29 °C; y en donde la etapa de extracción con n-butanol se lleva a cabo en contracorriente, preferiblemente a una temperatura que varía de 22 °C a 25 °C, durante un periodo de tiempo de 8 horas.
4. El método según se reivindica en la reivindicación 2, en donde la etapa de concentración se lleva a cabo mediante concentración al vacío.
5. El método según se reivindica en la reivindicación 2, en donde dicho adsorbente es un lecho de resina, preferiblemente Amberlite XAD-16; en donde el disolvente para lavar el adsorbente se selecciona de un grupo que comprende alcohol isopropílico, etanol y agua desionizada, o cualquier combinación de estos; en donde el disolvente para volver a lavar el adsorbente se selecciona de un grupo que comprende solución salina de cloruro de sodio y agua, o una combinación de estos; y en donde dicho disolvente alcohólico se selecciona de un grupo que comprende etanol y alcohol isopropílico, y es preferiblemente alcohol isopropílico.
6. Una composición que comprende Trigofoenósido, Vitexina, Iso-vitexina, Vitexina-2-o-ramnósido, Vicenina-1 y fibra, opcionalmente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en hipoxia, hipertensión pulmonar, fibrosis pulmonar y sinusitis, o cualquier combinación de estas; en donde el Trigofoenósido, la Vitexina, la Iso-vitexina, la Vitexina-2-o-ramnósido y la Vicenina-1 tienen juntos una concentración que varía del 8 % p/p al 31 % p/p; y la fibra está presente en una concentración que varía del 69% p/p al 92% p/p.
7. La composición según se reivindica en la reivindicación 1 o la composición para uso según se reivindica en la reivindicación 6, en donde el Trigofoenósido está presente en una concentración que varía del 0,1% p/p al 8% p/p; la Vitexina está presente en una concentración que varía del 0,5 % p/p al 5 % p/p; la Iso-vitexina está presente en una concentración que varía del 0,5 % p/p al 7 % p/p; la Vitexina-2-o-ramnósido está presente en una concentración que varía del 0,5 % p/p al 4 % p/p; y la fibra está presente en una concentración que varía del 69% p/p al 92% p/p.
8. La composición según se reivindica en la reivindicación 1 o la composición para uso según se reivindica en la reivindicación 6, en donde el excipiente farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que comprende goma, agente granulador, aglutinante, lubricante, agente desintegrante, agente edulcorante, aditivo, disolvente, deslizante, antiadherente, agente anti-estático, antioxidante, tensioactivo, potenciador de la viscosidad, material celulósico vegetal, agente colorante, agente aromatizante, agente de recubrimiento, plastificante, conservante, agente de

suspensión, agente emulsionante y agente de esferonización o cualquier combinación de estos.

- 5 9. La composición para su uso según se reivindica en la reivindicación 6, en donde la composición se formula en formas de dosificación seleccionadas del grupo que comprende formulación oral sólida, formulación oral líquida, formulación para inhalación, formulación nasal, formulación parenteral, fitocéticos, nutracéuticos y productos alimenticios o cualquier combinación de estos.
- 10 10. La composición para su uso según se reivindica en la reivindicación 9, en donde la formulación oral sólida se selecciona del grupo que comprende comprimidos, cápsulas, pastillas medicadas, pastillas para chupar, polvos dispersables, gránulos dispersables o cualquier combinación de estos; la formulación oral líquida se selecciona del grupo que comprende suspensión, emulsión, gotas, emulsión en cápsula de gel dura o blanda, jarabe, elixir o cualquier combinación de estos; la formulación parenteral se selecciona del grupo que comprende inyección intravenosa, inyección intramuscular, depósito intramuscular, inyección subcutánea, inyección percutánea o cualquier combinación de estos; la formulación para inhalación se selecciona del grupo que comprende inhalador, inhalador de polvo seco, nebulizador o cualquier combinación de estos; y la formulación nasal se selecciona del grupo que comprende gotas nasales, aerosoles nasales o una combinación de estos.
- 15 11. La composición para su uso según se reivindica en la reivindicación 6, en donde la composición se administra a una dosis que varía de 1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal de dicho sujeto, preferiblemente de 1 mg/kg a 40 mg/kg de peso corporal de dicho sujeto.
- 20 12. La composición para su uso según se reivindica en la reivindicación 6, en donde la composición se administra como un aerosol o inhalador en una dosis que varía de 1 µg/kg a 100 µg/kg de peso corporal de dicho sujeto, preferiblemente de 1 µg/kg a 25 µg/kg de peso corporal de dicho sujeto.
13. La composición para su uso según se reivindica en la reivindicación 6, en donde el sujeto es un mamífero, incluido un ser humano.

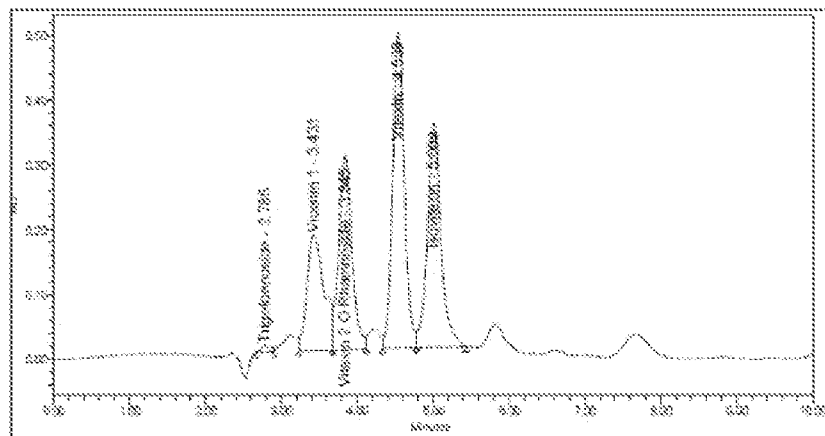


Figura 1a

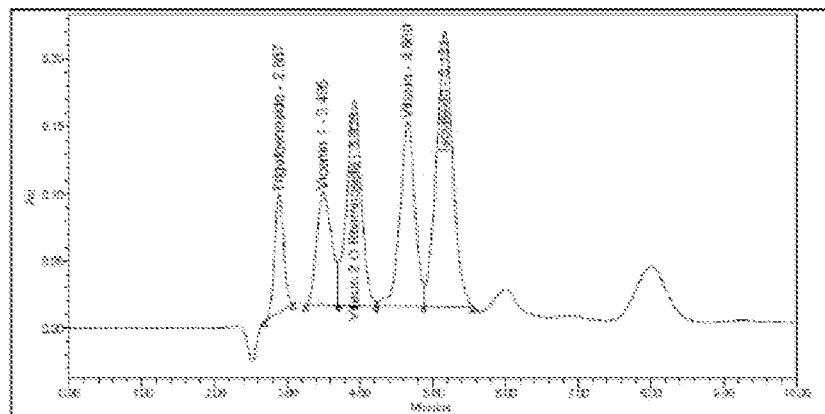


Figura 1b

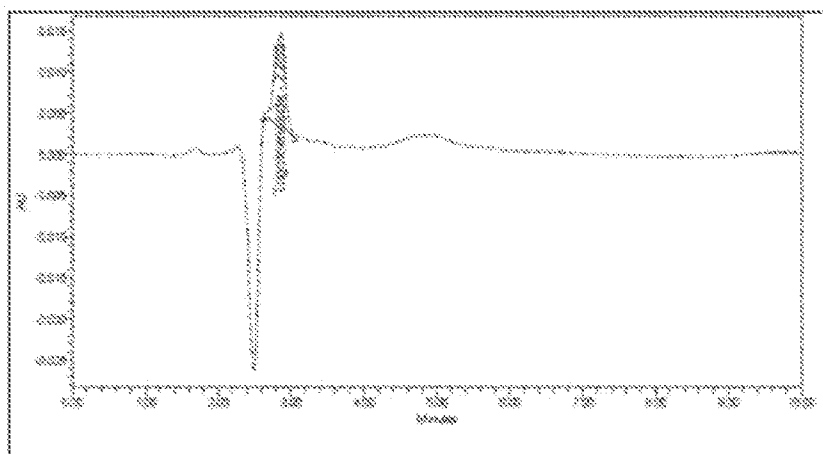


Figura 2a

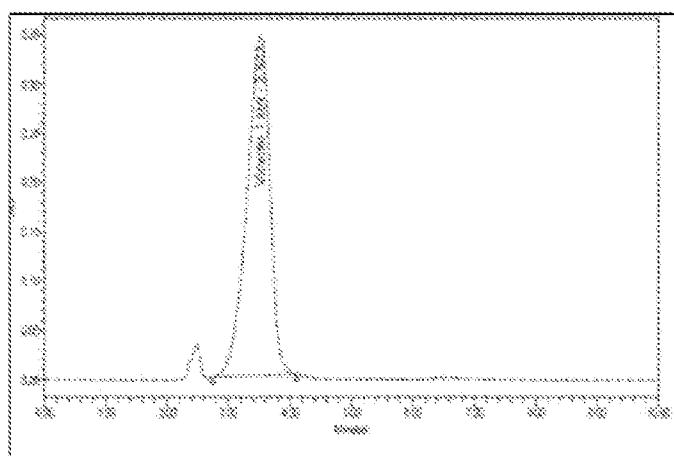


Figura 2b

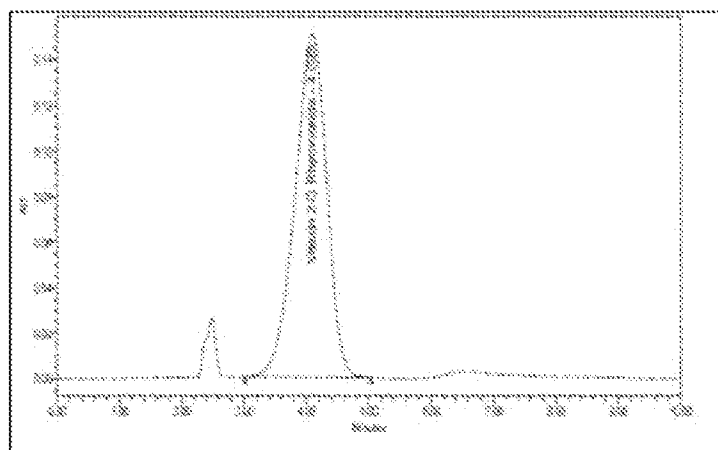


Figura 2c

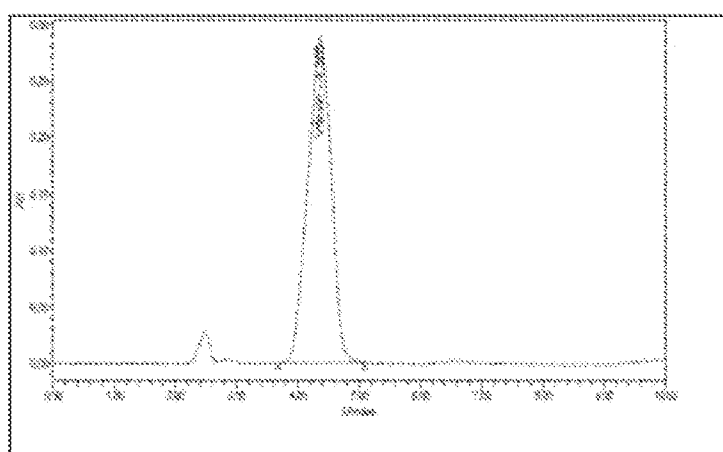


Figura 2d

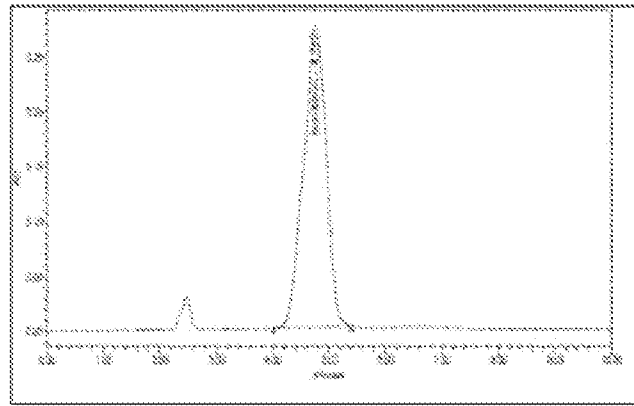


Figura 2e

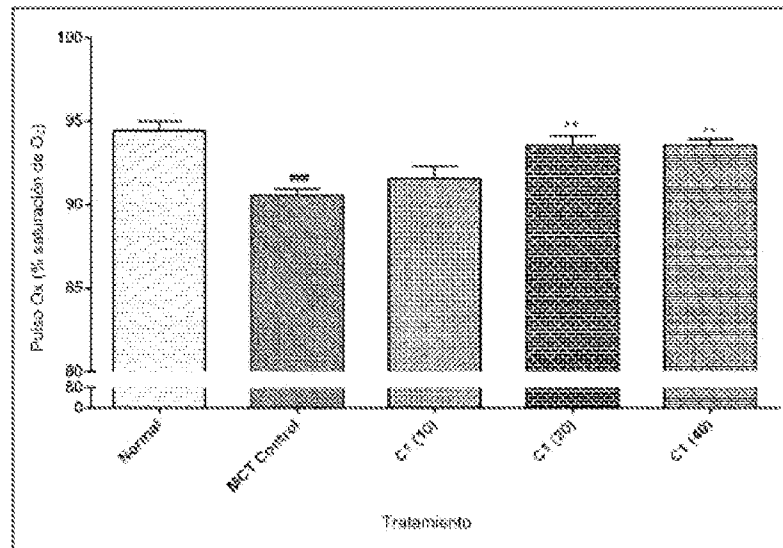


Figura 3

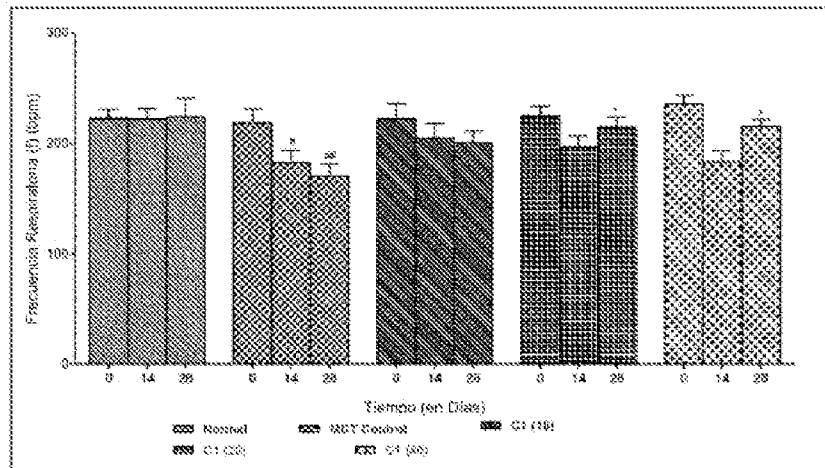


Figura 4

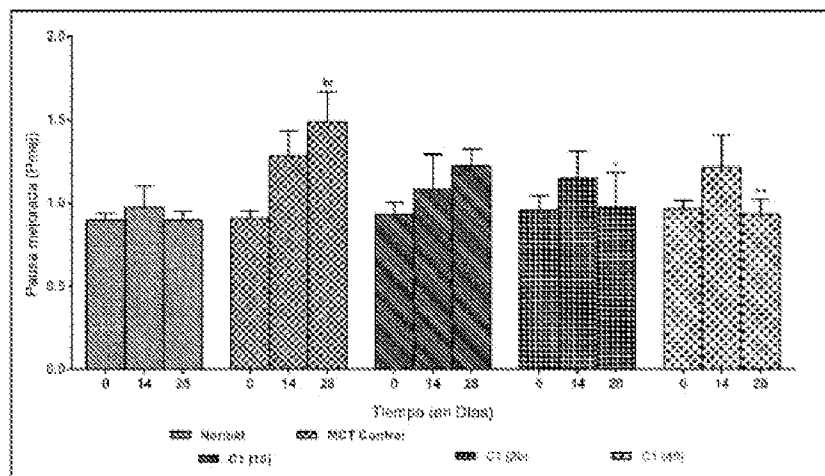


Figura 5

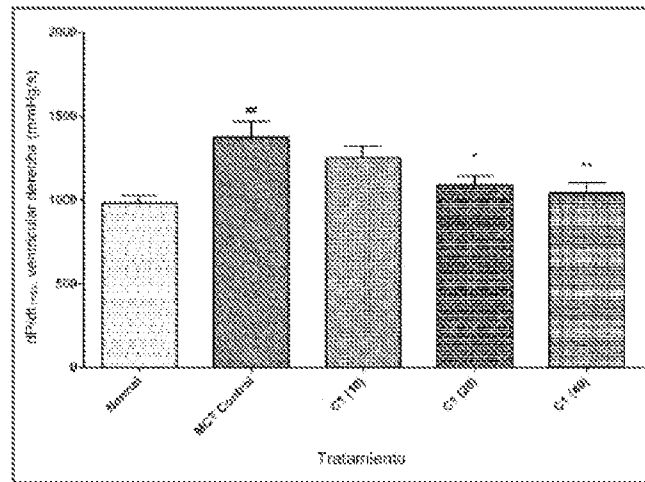


Figura 6a

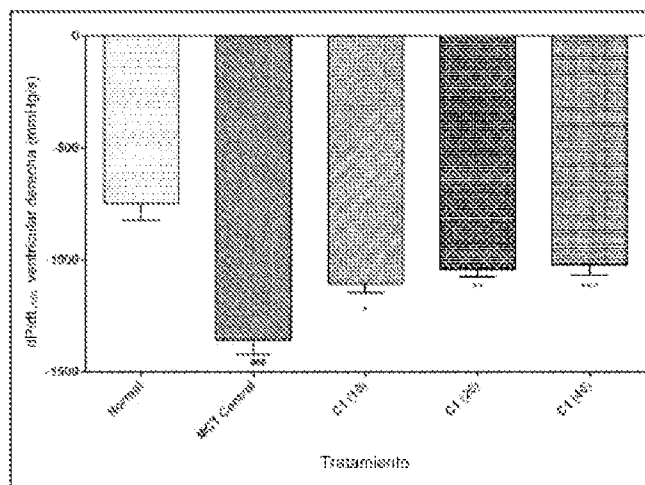


Figura 6b

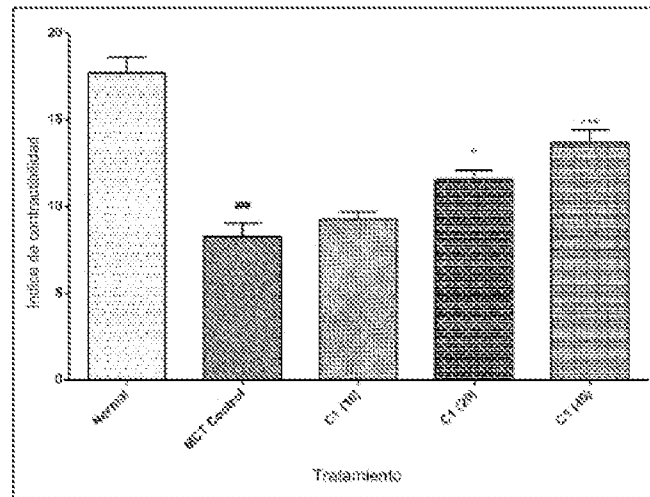


Figura 7a

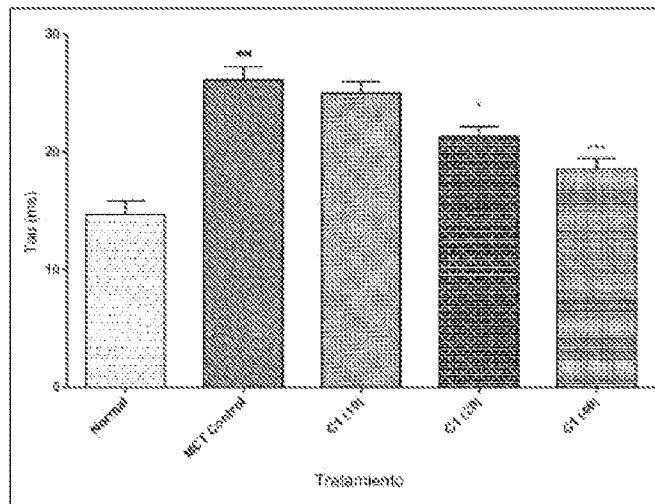


Figura 7b

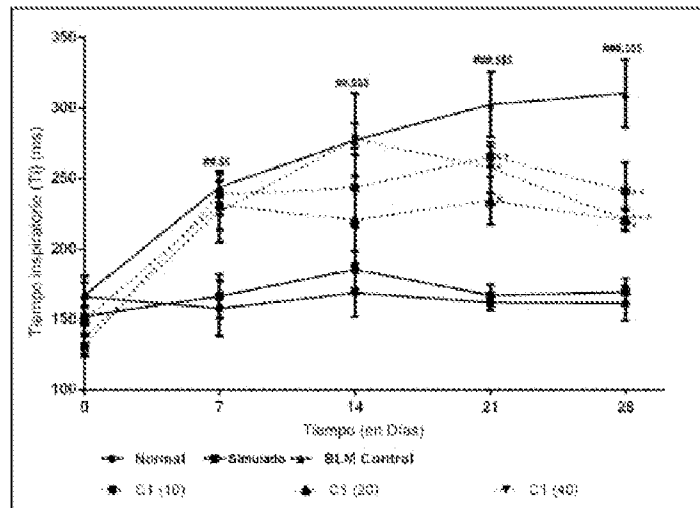


Figura 8

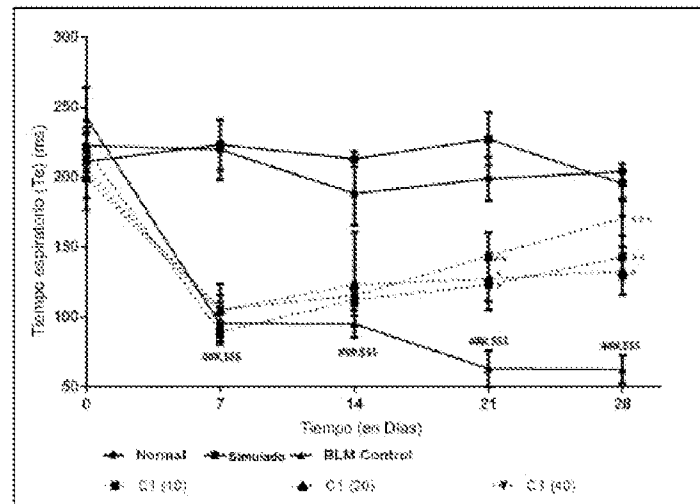


Figura 9

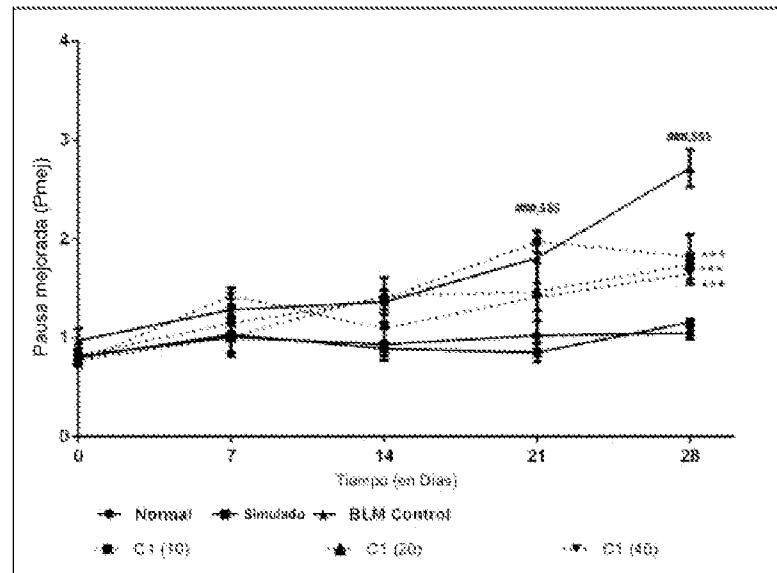


Figura 10

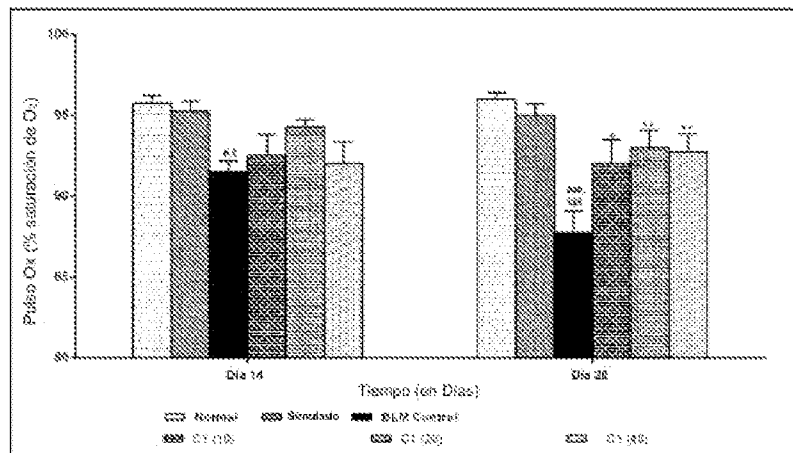


Figura 11

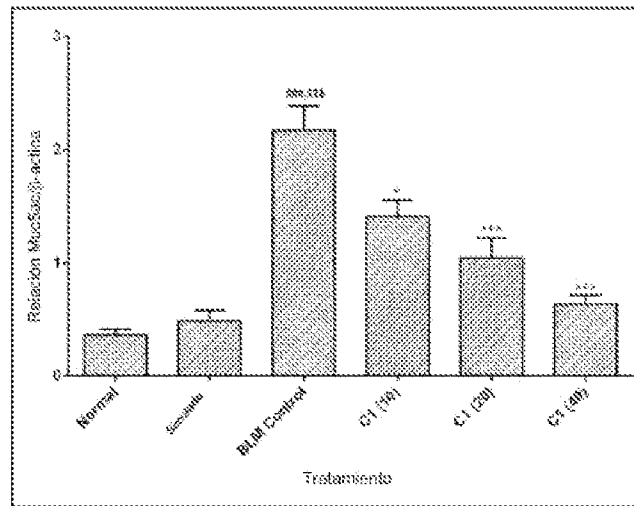


Figura 12

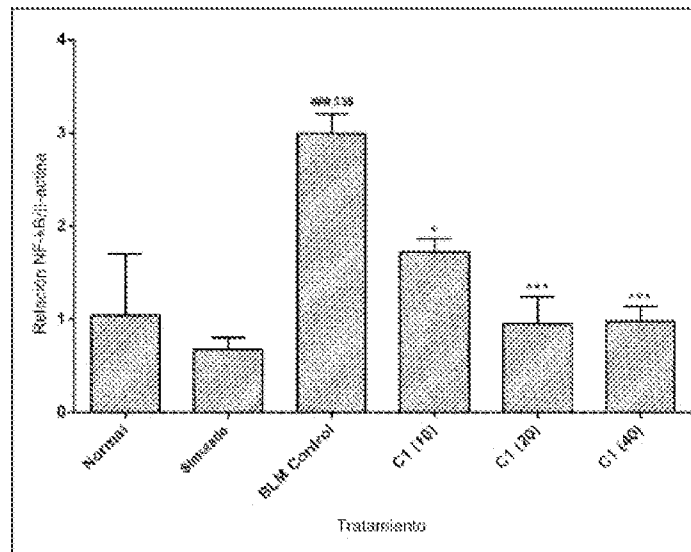


Figura 13