

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 782**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 31/19** (2006.01)

**A61K 9/107** (2006.01)

**A61K 36/28** (2006.01)

**A61K 9/48** (2006.01)

**A61K 31/357** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2004 E 04793556 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 1682088**

54 Título: **Composición de microemulsión oral que comprende bifenildicarboxilato de dimetilo y silibina**

30 Prioridad:

**21.10.2003 KR 2003073462**

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

**03.06.2013**

73 Titular/es:

**HANMI PHARM. CO., LTD. (100.0%)  
893-5 Hajeo-ri Paltan-myeon  
Hwaseong-gun, Kyungki-do 445-910 , KR**

72 Inventor/es:

**WOO, JONG SOO;  
JUNG, SI YOUNG y  
KIM, AE GUK**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

**ES 2 405 782 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición de microemulsión oral que comprende bifenildicarboxilato de dimetilo y silibina.

### Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una composición de microemulsión oral para tratar enfermedades hepáticas, que comprende bifenildicarboxilato de dimetilo (BDD) y silibina o un derivado de la misma, como principios activos.

### Antecedentes de la invención

- 10 Se ha sabido que el bifenildicarboxilato de dimetilo (BDD), un derivado sintético de esquizandrina C que es uno de los principios activos aislados de *Schizandra chinensis*, reduce el nivel de SGPT (transaminasa glutámico-pirúvica en suero) de un paciente al que se le administra el mismo, y por consiguiente, es útil para tratar enfermedades hepáticas incluyendo hepatitis viral aguda/crónica, una enfermedad hepática crónica e insuficiencia hepática por toxicidad farmacológica. (Véase [H. S. Lee, M. D., Y. T. Kim, M. D. *et al.*, "Prospective, randomized, controlled trial with biphenyl-dimethyl-dicarboxylate in chronic active liver disease; The effect on lowering serum alanine aminotransferase levels, Dept. Of Internal Medicine and Liver Research Institute, Seoul Nat'l Univ. College of Medicine, Seúl, Corea]).

- 15 Además, se sabe que la silibina, el componente principal de un extracto de *Carduus marianus*, tiene excelente actividad en la protección de células hepáticas frente a efectos perjudiciales provocados por fumar, beber alcohol, trabajar en exceso, contaminantes ambientales, estrés o fármacos que dañan el hígado, y la regeneración de las células hepáticas. Sin embargo, la biodisponibilidad de silibina o BDD administrado por vía oral es insatisfactoriamente baja debido a sus bajas solubilidades en agua.

- 20 El documento KR 98 083 257 da a conocer composiciones de microemulsión oral que comprenden BDD. El documento WO 01/01961 da a conocer composiciones de microemulsión oral que comprenden silibina o extracto de *Carduus marianus*.

- 25 Las enfermedades hepáticas están provocadas principalmente por una combinación de muchos factores diferentes, y por tanto, no puede obtenerse un resultado terapéutico satisfactorio cuando se usa solo un fármaco que tiene un determinado mecanismo de trabajo.

No obstante, la administración de una combinación de dos o más fármacos puede dar lugar a un efecto secundario indeseable o antagonismo inducido por interacciones físicas o químicas entre los fármacos.

- 30 Por consiguiente, ha existido una necesidad de desarrollar una composición oral mejorada para tratar enfermedades hepáticas, que comprenda dos o más tipos de fármacos que tengan mecanismos de trabajo totalmente diferentes, tenga altas biodisponibilidades de los fármacos *in vivo*, y no provoque efectos secundarios perjudiciales.

### Sumario de la invención

Por tanto, un objeto principal de la presente invención es proporcionar una composición de microemulsión oral que comprende tanto bifenildicarboxilato de dimetilo como silibina como principios activos.

- 35 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición de microemulsión oral para tratar una enfermedad hepática, que comprende (1) bifenildicarboxilato de dimetilo (BDD) y (2) silibina o un derivado de la misma, o un extracto de *Carduus marianus* que contiene silibina y derivados de la misma, como principios activos; un co-tensioactivo; un tensioactivo; y un aceite; en la que el derivado de silibina es silicristina, silidiamina o isosilibina.

### Descripción detallada de la invención

- 40 La composición de la invención se caracteriza por comprender bifenildicarboxilato de dimetilo y silibina o un derivado de la misma, o un extracto de *Carduus marianus* que contiene silibina y derivados de la misma, como principios activos en forma de emulsión estable, proporcionando de ese modo biodisponibilidades *in vivo* enormemente aumentadas de ambos de los principios activos.

- 45 Los respectivos componentes empleados en la preparación de la composición de microemulsión de la invención se describen tal como sigue.

#### (1) Principio activo

- 50 En la presente invención, se usan bifenildicarboxilato de dimetilo insoluble en agua, y un extracto de *Carduus marianus*, o silibina o un derivado de silibina aislado del mismo, como principios activos, siendo el derivado de silibina silicristina, silidiamina o isosilibina. Un extracto de *Carduus marianus* comercialmente disponible contiene normalmente silibina en una cantidad de aproximadamente el 30% en peso o más. Por ejemplo, el extracto de *Carduus marianus* de IVAX Co. (República Checa) contiene el 42% en peso de silibina, mientras que el de Zhejiang

Hengdian Co. (China), el 33% en peso de silibina.

(2) Co-tensioactivo

5 La composición de la invención contiene un disolvente orgánico como co-tensioactivo, que es anfipático, es decir, tanto hidrófilo como hidrófobo. El co-tensioactivo sirve para emulsionar los principios activos poco solubles en agua y mantener la forma emulsionada de los principios activos estable durante el almacenamiento. Los ejemplos representativos del co-tensioactivo incluyen etanol, propilenglicol (1,2-dihidroxiopropano), polietilenglicol (preferiblemente que tiene un peso molecular de 200 a 600), carbonato de propileno (4-metil-2-oxo-1,3-dioxolano), transcutool (monoetil éter de dietilenglicol), glicofurol (polietilenglicol éter de alcohol tetrahidrofurfurílico), dimetil-isosorbida (1,4:3,6-dianhidro-2,5-dimetil-D-glucitol) y una mezcla de los mismos, en los que se prefiere transcutool.

10 (3) Tensioactivo

El tensioactivo usado en la presente invención desempeña el papel de emulsionar un aceite en agua con la ayuda del co-tensioactivo para formar una microemulsión estable y puede ser uno cualquiera de los tensioactivos anfóteros, no iónicos, catiónicos o aniónicos farmacéuticamente aceptables.

Los ejemplos representativos del tensioactivo incluyen:

15 (1) aceites vegetales hidrogenados o naturales polioxietilenglicolados tales como aceite de ricino hidrogenado o natural polioxietilenglicolado (Cremophor<sup>®</sup>, BASF y HCO<sup>®</sup>, Nikkol),

(2) ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano en los que el ácido graso es mono o tri-ácido láurico, palmítico, esteárico u oleico (Tween<sup>®</sup>, ICI),

(3) ésteres de ácidos grasos de polioxietileno tales como éster de ácido esteárico de polioxietileno (Myrj<sup>®</sup>, ICI),

20 (4) copolímero de polioxietileno-polioxipropileno (Pluronic<sup>®</sup>, BASF),

(5) copolímero en bloque de polioxietileno-polioxipropileno (Poloxamer<sup>®</sup>, BASF),

(6) dioctil-sulfosuccinato de sodio o laurilsulfato de sodio,

(7) fosfolípidos,

25 (8) mono o di-ésteres de ácidos grasos de propilenglicol tales como dicaprilato de propilenglicol, dilaurato de propilenglicol, isoestearato de propilenglicol, laurato de propilenglicol, ricinoleato de propilenglicol y diéster de ácido caprílico-cáprico de propilenglicol (Miglyol<sup>®</sup> 840, Hüls),

(9) productos de transesterificación de polialquilenpolioles y triglicéridos de aceites vegetales naturales (Labrafil<sup>®</sup> M, Gattefosse),

(10) mono, di o mono/di-glicéridos tales como mono y di-glicéridos de ácido caprílico/cáprico (Imwitor<sup>®</sup>, Hüls),

30 (11) ésteres de ácidos grasos de sorbitano tales como ésteres de monolaurílico de sorbitano, monopalmitílico de sorbitano y monoestearílico de sorbitano (Span<sup>®</sup>, ICI), y

(12) esteroides o derivados de los mismos tales como colesterol, pitosterol y citosterol.

35 Los tensioactivos mencionados anteriormente pueden usarse solos o en combinación. Se prefieren aceites vegetales hidrogenados o naturales polioxietilenglicolados, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano y una mezcla de los mismos.

(4) Aceite

El aceite puede ser uno cualquiera de los aceites farmacéuticamente aceptables que son compatibles con el co-tensioactivo y el tensioactivo usados, que puede emulsionarse de manera estable en agua para formar una microemulsión estable. Los ejemplos representativos del aceite incluyen:

40 (1) triglicéridos de ácidos grasos, preferiblemente triglicéridos de ácidos grasos de cadena media, tales como aceite de coco fraccionado (Miglyol<sup>®</sup> 812N, Hüls),

(2) mono, di o mono/di-glicéridos, preferiblemente mono o di-glicéridos de ácido oleico,

(3) ésteres de ácidos grasos y alcoholes monovalentes, preferiblemente ésteres de ácidos grasos C<sub>8-20</sub> y alcoholes monovalentes C<sub>2-3</sub>, tales como miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, linoleato de etilo y oleato de etilo,

45 (4) aceites animales o vegetales naturales tales como aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja y aceite de pescado,

(5) hidratos de carbono tales como escualeno y escualano, y

(6) ácidos grasos libres, preferiblemente ácido oleico y ácido linoleico en una forma fluida.

5 El aceite mencionado anteriormente puede usarse solo o en combinación con otros aceites, y se prefieren triglicéridos de ácidos grasos de cadena media, mono, di o mono/di-glicéridos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes monovalentes y una mezcla de los mismos.

En la preparación de la composición de microemulsión de la invención, el bifenildicarboxilato de dimetilo, el extracto de *Carduus marianus* (silibina o un derivado de silibina), el co-tensioactivo, el tensioactivo y el aceite pueden usarse en cantidades que corresponden a una razón en peso en el intervalo de 1 : 1~100 (0,3~33) : 10~150 : 5~100 : 1~50, preferiblemente, 1 : 5~60 (1,7~20) : 20~100 : 10~80 : 5~20.

10 Además, la composición de la invención puede comprender aditivos farmacéuticamente aceptables para administración oral, por ejemplo, agentes que controlan la viscosidad, agentes aromáticos, antioxidantes (por ejemplo, ácido eritórico y D- $\alpha$ -tocoferol) o conservantes, etc.

15 La composición de la invención puede prepararse mezclando y disolviendo los componentes de manera uniforme, y forma micropartículas emulsionadas que tienen un tamaño de partícula promedio de menos de 1  $\mu$ m en contacto con un medio acuoso.

La composición de microemulsión de la presente invención puede formularse en una cápsula dura o blanda, según cualquiera de los procedimientos convencionales.

20 Una dosis diaria típica de bifenildicarboxilato de dimetilo y un extracto de *Carduus marianus* puede oscilar entre aproximadamente 3 y 120 mg/kg y 25 y 175 mg/kg, preferiblemente entre 3 y 60 mg/kg y entre 25 y 175 mg/kg, respectivamente, y puede administrarse en una dosis única o en dosis divididas. Sin embargo, debe entenderse que la cantidad de los principios activos realmente administrada debe determinarse a la vista de diversos factores relevantes incluyendo el estado que va a tratarse, la edad, el sexo y el peso corporal del paciente individual, y la gravedad del síntoma del paciente; y, por tanto, no debe pretenderse que la dosis anterior limite el alcance de la invención de ningún modo.

25 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente la presente invención sin limitar su alcance.

Ejemplo 1: Preparación de una cápsula blanda que contiene una composición de microemulsión

Se preparó una cápsula blanda usando los siguientes componentes:

	<u>Cantidad (mg/cápsula)</u>
Extracto de <i>Carduus marianus</i> (como silibina)	120 (36)
BDD	3
Transcutol	315
HCO <sup>®</sup> 50	170
Tween <sup>®</sup> 20	130
Ácido eritórico	8
Miglyol <sup>®</sup> 812N	12
Linoleato de etilo	45
Mono-oleato de glicerilo	20
D- $\alpha$ -tocoferol	7

30 Se disolvieron bifenildicarboxilato de dimetilo (BDD) y extracto de *Carduus marianus* (IVAX, República Checa, contenido en silibina: 42% en peso) en transcutol de manera uniforme, y se disolvieron otros componentes en el mismo, obteniendo un concentrado previo de microemulsión. Entonces, se usó el concentrado previo resultante para cargar una cápsula blanda según el método convencional descrito en la norma de preparación general de la Farmacopea coreana. Se preparó la cápsula blanda usando ácido succínico, gelatina, glicerina y agua purificada mediante un método convencional.

Ejemplo 2: Preparación de una cápsula blanda que contiene una composición de microemulsión

35 Se preparó una cápsula blanda mediante el procedimiento del ejemplo 1 usando los siguientes componentes:

	<u>Cantidad (mg/cápsula)</u>
Extracto de <i>Carduus marianus</i> (como silibina)	60 (18)
BDD	3
Transcutol	200
HCO <sup>®</sup> 50	150
Tween <sup>®</sup> 20	100
Ácido eritórico	8

Miglyol® 812N	10
Linoleato de etilo	30
Mono-oleato de glicerilo	10
D- $\alpha$ -tocoferol	5

**Ejemplo 3:** Preparación de una cápsula blanda que contiene una composición de microemulsión

Se preparó una cápsula blanda mediante el procedimiento del ejemplo 1 usando los siguientes componentes:

	<u>Cantidad (mg/cápsula)</u>
Extracto de <i>Carduus marianus</i> (como silibina)	175 (52,5)
BDD	3
Transcutol	460
HCO® 50	246
Tween® 20	188
Ácido eritórico	10
Miglyol® 812N	17
Linoleato de etilo	65
Mono-oleato de glicerilo	29
D- $\alpha$ -tocoferol	10

**Ejemplo 4:** Preparación de una cápsula blanda que contiene una composición de microemulsión

Se preparó una cápsula blanda mediante el procedimiento del ejemplo 1 usando los siguientes componentes:

	<u>Cantidad (mg/cápsula)</u>
Extracto de <i>Carduus marianus</i> (como silibina)	175 (52,5)
BDD	25
Transcutol	600
HCO® 50	220
Tween® 20	1170
Miglyol® 812N	20
Linoleato de etilo	20
Mono-oleato de glicerilo	50
D- $\alpha$ -tocoferol	10

5 **Ejemplo 5:** Preparación de una cápsula blanda que contiene una composición de microemulsión

Se preparó una cápsula blanda mediante el procedimiento del ejemplo 1 usando los siguientes componentes:

	<u>Cantidad (mg/cápsula)</u>
Extracto de <i>Carduus marianus</i> (como silibina)	120(36)
BDD	3
Dimetil-isosorbida	310
HCO® 50	160
Poloxamer®	130
Miglyol® 812N	40
Ácido oleico	20
Mono-oleato de glicerilo	40
D- $\alpha$ -tocoferol	6

**Ejemplo 6:** Preparación de una cápsula blanda que contiene una composición de microemulsión

Se preparó una cápsula blanda mediante el procedimiento del ejemplo 1 usando los siguientes componentes:

	<u>Cantidad (mg/cápsula)</u>
Extracto de <i>Carduus marianus</i> (como silibina)	120(36)
BDD	7,5
Transcutol	340
HCO® 50	180
Tween® 20	150
Ácido eritórico	9
Miglyol® 812N	18
Linoleato de etilo	60
Mono-oleato de glicerilo	20
D- $\alpha$ -tocoferol	10

**Ejemplo de prueba 1:** Efecto terapéutico sobre el hígado dañado por tetracloruro de carbono

Se examinó el efecto terapéutico de la composición de microemulsión oral de la invención sobre el hígado dañado por CCl<sub>4</sub> tal como sigue.

5 Se dividieron treinta y seis ratas Sprague Dawley macho de 4 a 5 semanas de edad en seis grupos que consistían cada uno en 6 ratas que tenían un peso corporal promedio de  $202 \pm 5$  g. Se aclimataron las ratas al ambiente de la jaula fijado a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  y el  $55 \pm 5\%$  de humedad relativa. Entonces se administró por vía intraperitoneal una disolución al 50% (v/v) de tetracloruro de carbono en aceite de maíz a cada rata de cinco grupos experimentales (grupos 1 a 5) a una dosis de 0,75 ml/kg, dos veces a la semana (lunes y viernes) para inducir hepatotoxicidad.

10 No se trataron las ratas del grupo 1 (control negativo) con ningún fármaco terapéutico tras la inyección de CCl<sub>4</sub>. Se administró por vía oral a las ratas del grupo 2 (control positivo) BDD suspendido en CMC (carboximetilcelulosa) al 1% (p/v) una vez al día, seis veces a la semana tras la inyección de CCl<sub>4</sub>, en una cantidad correspondiente a 25 mg/kg de BDD; a las ratas del grupo 3, un extracto de *Carduus marianus* suspendido en CMC al 1% (p/v), en una cantidad correspondiente a 175 mg/kg del extracto de *Carduus marianus* (52,5 mg/kg como silibina); y a las ratas del grupo 4, una mezcla sencilla de BDD y extracto de *Carduus marianus* suspendida en CMC al 1% (p/v), en una cantidad correspondiente a 25 mg/kg de BDD y 175 mg/kg del extracto de *Carduus marianus*. Se administró por vía oral a las ratas del grupo 5 la formulación del ejemplo 3 una vez al día, seis veces a la semana, en una cantidad correspondiente a 3 mg/kg de BDD y 175 mg/kg del extracto de *Carduus marianus*; y no se sometieron las ratas del grupo 6 (grupo normal) a inyección de CCl<sub>4</sub> y no se les administraron fármacos terapéuticos.

20 Cuatro semanas tras la administración, se sacrificaron las ratas y se tomaron muestras de suero según un calendario predeterminado. Se midieron los niveles de ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato aminotransferasa) en suero según un método convencional, y se muestran los resultados en las tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1

Grupo animal	ALT* (SF U/ml)	Razón del nivel de ALT con respecto a un control (%)
Grupo 1 (control)	150,2 ± 26,0	100
Grupo 2 (BDD)	137,7 ± 19,5	91,7
Grupo 3 (silibina)	129,8 ± 10,1	86,4
Grupo 4 (BDD+silibina)	90,1 ± 7,3	59,9
Grupo 5 (ejemplo 3)	50,3 ± 8,4	33,5
Grupo 6 (normal)	30,5 ± 5,8	-

\*: una concentración promedio de ALT ± desviación estándar

Tabla 2

Grupo animal	AST* (SF U/ml)	Razón del nivel de AST con respecto a un control (%)
Grupo 1 (control)	171,5 ± 11,9	100
Grupo 2 (BDD)	163,3 ± 4,5	95,2
Grupo 3 (silibina)	158,6 ± 8,6	92,4
Grupo 4 (BDD+silibina)	112,1 ± 6,1	65,4
Grupo 5 (ejemplo 3)	80,1 ± 8,5	46,7
Grupo 6 (normal)	66,2 ± 15,3	-

\*: una concentración promedio de AST ± desviación estándar

25 Tal como se muestra en las tablas 1 y 2, para el grupo 4 (BDD+silibina) y el grupo 5 (ejemplo 3) a los que se les administraron BDD y silibina simultáneamente, el aumento en los niveles de ALT y AST inducido por CCl<sub>4</sub> fue menor en un factor de 2 a 3 en comparación con el grupo 2 (BDD) o el grupo 3 (silibina).

30 La preparación de microemulsión de la invención (grupo 5) que contenía los dos principios activos en forma emulsionada, en particular, presentó un efecto inhibitor mucho mayor que el observado para la mezcla sencilla de BDD y silibina (grupo 4), a pesar del hecho de que la cantidad de BDD administrada al grupo 5 fue menor que al grupo 4.

Estos resultados demuestran que la preparación de microemulsión de la invención tiene un efecto terapéutico superior sobre daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub> debido a las biodisponibilidades potenciadas de ambos de los principios activos contenidos en la misma.

Ejemplo de prueba 2: Efecto terapéutico dependiente de la dosis sobre el daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub>

35 Con el fin de examinar el cambio en el efecto terapéutico de la composición de microemulsión oral de la invención con las dosis de los principios activos, se realizaron pruebas con el hígado dañado por CCl<sub>4</sub> tal como sigue.

Se indujo hepatotoxicidad en ratas mediante administración de tetracloruro de carbono según el procedimiento del ejemplo de prueba 1, excepto porque se usaron cinco grupos de ratas Sprague Dawley que consistían cada uno en 6 ratas.

5 No se trataron las ratas del grupo 1 (control negativo) con ningún fármaco terapéutico tras la inyección de CCl<sub>4</sub>; y se administró por vía oral a las ratas de los grupos 2 a 4 la formulación preparada en los ejemplos 2, 1 y 3, respectivamente, una vez al día, seis veces a la semana a una dosificación de una cápsula/kg, tras la inyección de CCl<sub>4</sub>. Las ratas del grupo 5 (grupo normal) no recibieron ni inyección de CCl<sub>4</sub> ni un fármaco terapéutico.

Cuatro semanas tras la administración, se midieron los niveles de ALT y AST en suero, y se muestran los resultados en las tablas 3 y 4, respectivamente.

10 Tabla 3

Grupo animal	ALT* (SF U/ml)	Razón del nivel de ALT con respecto a un control (%)
Grupo 1 (control)	130,8 ± 10,0	100
Grupo 2 (ejemplo 2)	82,5 ± 8,6	63,1
Grupo 3 (ejemplo 1)	63,2 ± 6,5	48,3
Grupo 4 (ejemplo 3)	65,4 ± 7,5	50,0
Grupo 5 (normal)	30,6 ± 4,3	-

\*: una concentración promedio de ALT ± desviación estándar

Tabla 4

Grupo animal	AST* (SF U/ml)	Razón del nivel de AST con respecto a un control (%)
Grupo 1 (control)	213,7 ± 19,5	100
Grupo 2 (ejemplo 2)	133,3 ± 8,7	62,4
Grupo 3 (ejemplo 1)	119,9 ± 10,3	56,1
Grupo 4 (ejemplo 3)	109,8 ± 5,9	51,4
Grupo 5 (normal)	78,7 ± 3,3	-

\*: una concentración promedio de AST ± desviación estándar

15 Tal como se muestra en las tablas 3 y 4, el efecto inhibitorio de la preparación de microemulsión de la invención frente al aumento en los niveles de ALT y AST en suero depende de las dosificaciones de los principios activos, BDD y extracto de *Carduus marianus*. Si la razón de extracto de *Carduus marianus*/BDD (p/p) es más de 40, el efecto permanece más o menos sin cambios.

#### Ejemplo de prueba 3: Efecto terapéutico sobre hígado graso inducido por dl-etionina

Con el fin de examinar el efecto terapéutico de la composición de microemulsión oral de la invención, se realizó una prueba para medir la actividad de recuperación de hígado graso inducido por dl-etionina tal como sigue.

20 Se prepararon seis grupos de ratas, que consistían cada uno en 6 ratas, mediante el procedimiento del ejemplo de prueba 1. Se inyectó por vía subcutánea una solución salina de dl-etionina al 2% (p/v) a cada rata de cinco grupos experimentales (grupos 1 a 5) a una dosificación de 200 mg/kg, dos veces a la semana para inducir hígado graso.

25 No se trataron las ratas del grupo 1 (control negativo) con ningún fármaco terapéutico tras la inyección de etionina. Se administró por vía oral a las ratas del grupo 2 (control positivo) BDD suspendido en CMC al 1% (p/v) una vez al día, cinco veces a la semana tras la inyección de etionina, en una cantidad correspondiente a 25 mg/kg de BDD; a las ratas del grupo 3, el extracto de *Carduus marianus* suspendido en CMC al 1% (p/v), en una cantidad correspondiente a 175 mg/kg del extracto de *Carduus marianus* (52,5 mg/kg como silibina); y a las ratas del grupo 4, una mezcla sencilla de BDD y extracto de *Carduus marianus* suspendida en CMC al 1% (p/v), en una cantidad correspondiente a 25 mg/kg de BDD y 175 mg/kg del extracto de *Carduus marianus*. Se administró por vía oral a las ratas del grupo 5 la formulación del ejemplo 3 una vez al día, cinco veces a la semana, en una cantidad correspondiente a 3 mg/kg de BDD y 175 mg/kg del extracto de *Carduus marianus*; y las ratas del grupo 6 (grupo normal) no recibieron ni inyección de etionina ni ningún fármaco terapéutico.

30 Una semana tras la administración, se sacrificó cada rata, y se extrajo el hígado de la misma. Se lavó el hígado extraído con solución salina, se empapó en un volumen de 4 veces de tampón fosfato de potasio (pH 7,5), y se homogenizó con un homogeneizador de teflón-vidrio. Se sometió el hígado homogenizado a centrifugación a 600 x g durante 10 minutos para obtener un sobrenadante, que se sometió a centrifugaciones a 10.000 x g durante 20 minutos, y luego a 10.000 x g durante 1 hora, para obtener un sobrenadante.

35 Entonces, se midieron los niveles de colesterol total y triglicéridos de cada muestra de hígado empleando el sobrenadante según un método convencional, y se muestran los resultados en las tablas 5 y 6, respectivamente.

Tabla 5

Grupo animal	Colesterol total* (mg/g)	Razón del nivel de colesterol con respecto a un control (%)
Grupo 1 (control)	24,1 ± 1,4	100
Grupo 2 (BDD)	22,0 ± 1,9	91,3
Grupo 3 (silibina)	21,3 ± 3,5	88,4
Grupo 4 (BDD+silibina)	20,3 ± 2,9	84,2
Grupo 5 (ejemplo 3)	18,7 ± 3,7	77,6
Grupo 6 (normal)	17,2 ± 2,7	-

\*: una concentración promedio de colesterol total ± desviación estándar

Tabla 6

Grupo animal	Triglicérido* (mg/g)	Razón del nivel de triglicérido con respecto a un control (%)
Grupo 1 (control)	13,9 ± 2,5	100
Grupo 2 (BDD)	10,1 ± 0,5	72,7
Grupo 3 (silibina)	9,7 ± 2,5	69,8
Grupo 4 (BDD+silibina)	9,0 ± 2,2	64,7
Grupo 5 (ejemplo 3)	7,5 ± 0,1	54,0
Grupo 6 (normal)	5,5 ± 0,5	-

\*: una concentración promedio de triglicérido ± desviación estándar

5 Tal como se muestra en las tablas 5 y 6, para el grupo 4 (BDD+silibina) y el grupo 5 (ejemplo 3) a los que se les administraron BDD y silibina en combinación, el efecto inhibitorio frente al aumento en los niveles de colesterol y triglicéridos en hígado graso fue mucho mayor que el del grupo 2 (BDD) o el grupo 3 (silibina).

La preparación de microemulsión de la invención (grupo 5) que contenía los dos principios activos, en particular, presentó un efecto inhibitorio mucho mayor que la mezcla sencilla de BDD y silibina (grupo 4), a pesar del hecho de que la cantidad de BDD administrada al grupo 5 fue menor que al grupo 4.

10 Estos resultados demuestran que la preparación de microemulsión de la invención tiene un efecto terapéutico superior sobre hígado graso inducido por dl-etionina debido a las biodisponibilidades potenciadas de ambos de los principios activos contenidos en la misma.

Ejemplo de prueba 4: Efecto terapéutico dependiente de la dosis sobre hígado graso inducido por dl-etionina

15 Con el fin de examinar el cambio en el efecto terapéutico de la composición de microemulsión oral de la invención con las dosis de los principios activos, se realizaron pruebas con hígado graso inducido por dl-etionina tal como sigue.

Se indujo hepatotoxicidad en ratas mediante administración de dl-etionina según el procedimiento del ejemplo de prueba 3, excepto porque se usaron cinco grupos de ratas Sprague Dawley que consistían cada uno en 6 ratas.

20 No se trataron las ratas del grupo 1 (control negativo) con ningún fármaco terapéutico tras la inyección de etionina; y se administró por vía oral a las ratas de los grupos 2 a 4 la formulación preparada en los ejemplos 2, 1 y 3, respectivamente, una vez al día, cinco veces a la semana a una dosificación de una cápsula/kg, tras la inyección de etionina. Las ratas del grupo 5 (grupo normal) no recibieron ni inyección de etionina ni un fármaco terapéutico.

Una semana tras la administración, se midieron los niveles de colesterol y triglicérido en suero en el hígado, y se muestran los resultados en las tablas 7 y 8, respectivamente.

Tabla 7

Grupo animal	Colesterol total* (mg/g)	Razón del nivel de colesterol con respecto a un control (%)
Grupo 1 (control)	26,4 ± 2,5	100
Grupo 2 (ejemplo 2)	21,2 ± 1,8	80,3
Grupo 3 (ejemplo 1)	20,2 ± 1,7	76,5
Grupo 4 (ejemplo 3)	19,8 ± 2,4	75
Grupo 5 (normal)	17,7 ± 2,2	-

\*: una concentración promedio de colesterol total ± desviación estándar

25 Tabla 8

Grupo animal	Triglicérido*	Razón del nivel de triglicérido
--------------	---------------	---------------------------------

	(mg/g)	con respecto a un control (%)
Grupo 1 (control)	14,0 ± 0,7	100
Grupo 2 (ejemplo 2)	10,6 ± 0,5	75,7
Grupo 3 (ejemplo 1)	10,0 ± 2,2	71,4
Grupo 4 (ejemplo 3)	8,9 ± 0,4	63,6
Grupo 5 (normal)	5,5 ± 0,5	-

\*: una concentración promedio de triglicérido ± desviación estándar

Tal como se muestra en las tablas 7 y 8, el efecto inhibitor de la preparación de microemulsión de la invención frente al aumento en los niveles de colesterol y triglicérido en suero depende de la dosificación de los principios activos, BDD y extracto de *Carduus marianus*. Si la razón de extracto de *Carduus marianus*/BDD (p/p) es más de 40, el efecto permanece más o menos sin cambios.

#### 5 Ejemplo de prueba 5: Prueba de toxicidad aguda

Se examinó la toxicidad aguda de una preparación administrada por vía oral que contenía tanto BDD como silibina tal como sigue, usando ratas ICR que tenían un peso corporal promedio de 20 a 25 g cada una.

10 Se obtuvieron preparaciones de muestra mezclando BDD y silibina en diversas razones en peso tal como se muestra en la tabla 9 y se administró por vía oral cada una a un grupo que consistía en diez ratas a una dosis de 0,1, 0,2, 0,5, 1 y 2 g/kg. Una semana tras la administración, se contó el número de animales muertos para calcular la tasa de mortalidad (%), y se muestran los resultados en la tabla 9.

Tabla 9

BDD : silibina (razón en peso)	0,1 g	0,2 g	0,5 g	1 g	2 g
	Tasa de mortalidad (%)				
1 : 1	0	0	0	0	0
1 : 10	0	0	0	0	0
1 : 20	0	0	0	0	0
1 : 40	0	0	0	0	0
1 : 58	0	0	0	0	0

15 Tal como se muestra en la tabla 9, no hubo ningún signo de mortalidad o respuestas tóxicas a 2 g/kg de la preparación que contenía tanto BDD como silibina. Por consiguiente, se confirmó que la composición de la presente invención no es tóxica y es segura.

#### Ejemplo de prueba 6: Prueba de absorción

20 Con el fin de examinar las biodisponibilidades de los principios activos de la preparación de la invención, se llevó a cabo una prueba de absorción *in vivo* tal como sigue empleando la preparación del ejemplo 4 (preparación experimental) y una preparación obtenida mezclando simplemente 25 mg de BDD y 175 mg de un extracto de *Carduus marianus* (preparación comparativa).

Se aclimataron diez ratas Sprague-Dawley macho de 14 a 15 semanas de edad (peso: aproximadamente 250 g cada una) durante más de 4 días, mientras que se les permitía libre acceso a alimento y agua. Entonces se pusieron las ratas en un ayuno de 48 horas, mientras que se les permitió libre acceso a agua.

25 Se dividieron las ratas en dos grupos que consistían cada uno en cinco ratas, y se les administraron por vía oral las preparaciones experimentales y comparativas, respectivamente, en una cantidad correspondiente a 25 mg/kg de BDD y 175 mg/kg del extracto de *Carduus marianus* (58 mg/kg como silibina). Se extrajeron muestras de sangre de las ratas antes de la administración, y 0,5, 1, 1,5, 4, 8 y 24 horas tras la administración. Se obtuvieron muestras de plasma a partir de las muestras de sangre.

Se realizó el análisis para determinar la concentración de BDD en plasma tal como sigue.

30 Se añadieron 200 µl de metanol a 100 µl de plasma, y se agitó la mezcla. Se centrifugó la mezcla a 3.000 rpm durante 10 minutos para obtener un sobrenadante, que entonces se filtró a través de un filtro de 0,22 µm, y se analizó mediante CL-EM, en las siguientes condiciones.

- Columna: Waters EM C18 (2,1x150 mm con precolumna)

- Fase móvil: metanol al 50%

35 - Volumen de inyección: 10 µl

- Velocidad de flujo: 0,2 ml/min.

- Detector: modo SIR m/z: 441,2 (aducto de Na)

Se muestran los resultados en la tabla 10.

Tabla 10

Preparación	AUC <sup>1</sup> (ng·h/ml)	C <sub>max</sub> <sup>2</sup> (ng/ml)	T <sub>max</sub> <sup>3</sup> (hora)
Ejemplo 4	4935,7 ± 513,8	1198,5 ± 411,5	0,5 ± 0,0
Preparación comparativa	311,8 ± 115,5	29,7 ± 8,3	2,6 ± 1,7

\*1: Área bajo la curva de concentración de BDD en plasma frente al tiempo integrada para de 0 a 24 horas  
 \*2: Concentración de BDD en plasma máxima  
 \*3: Tiempo a la concentración de BDD en plasma máxima

Por otro lado se realizó el análisis para determinar la concentración de silibina en plasma tal como sigue.

- 5 Se combinaron 500 µl de cada muestra de suero con 50 µl de una disolución de patrón interno (disolución en metanol que contenía 2,0 µg/ml de naringenina), 900 µl de disolución de acetato de sodio 0,5 M (pH 5,0) y 100 µl de una disolución enzimática (disolución en acetato de sodio 0,5 M (pH 5,0) de β-glucuronidasa 13,48 unidades/sulfatasa 4,5 unidades), se mezclaron durante 5 minutos, y se mantuvo la mezcla a 37°C durante 4 horas. Se añadieron a la misma 1,5 ml de carbonato de sodio 1 M (pH 8,5), se agitó durante 10 minutos, se añadieron a la misma 5 ml de éter, y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos para obtener un extracto. Se centrifugó el extracto a 2.000 rpm durante 10 minutos para obtener un sobrenadante, y se condensaron 4,2 ml del sobrenadante a 30°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Se combinó el residuo resultante con 250 µl de una mezcla de metanol y dihidrogenofosfato de sodio 10 mM (50 : 50) y se sometió la mezcla a HPLC en las siguientes condiciones.
- 10
- 15 - Columna: Inertsil ODS2 (5 µm, 4,6 x 250 mm)  
 - Fase móvil: metanol : dihidrogenofosfato de sodio 10 mM = 50 : 50 (v : v, pH 3,0 por ácido fosfórico)  
 - volumen de inyección: 50 µl  
 - velocidad de flujo: 1,0 ml/min.  
 - Detector: UV 285 nm
- 20 Se muestran los resultados en la tabla 11.

Tabla 11

Preparación	AUC <sup>1</sup> (ng·h/ml)	C <sub>max</sub> <sup>2</sup> (ng/ml)	T <sub>max</sub> <sup>3</sup> (hora)
Ejemplo 4	115,3 ± 9,8	43,1 ± 6,7	0,8 ± 0,3
Preparación comparativa	8,9 ± 3,3	2,3 ± 1,1	1,1 ± 0,2

\*1: Área bajo la curva de concentración de silibina en plasma frente al tiempo integrada para de 0 a 24 horas  
 \*2: Concentración de silibina en plasma máxima  
 \*3: Tiempo a la concentración de silibina en plasma máxima

Tal como se muestra en las tablas 10 y 11, las biodisponibilidades de BDD y silibina observadas en la preparación de la invención son mucho mayores que las de la preparación comparativa, en aproximadamente factores de 15 y 10, respectivamente.

## REIVINDICACIONES

1. Composición de microemulsión oral para tratar una enfermedad hepática, que comprende
  - (1) bifenildicarboxilato de dimetilo (BDD) y
  - (2) silibina o un derivado de la misma, o un extracto de *Carduus marianus* que contiene silibina y derivados de la misma, como principios activos; un co-tensioactivo; un tensioactivo; y un aceite, en la que el derivado de silibina es silicristina, silidiamina o isosilibina.
- 5 2. Composición de microemulsión oral según la reivindicación 1, en la que la razón en peso de bifenildicarboxilato de dimetilo : extracto de *Carduus marianus* : co-tensioactivo : tensioactivo : aceite está en el intervalo de 1 : 1~100 : 10~150 : 5~100 : 1~50.
- 10 3. Composición de microemulsión oral según la reivindicación 1, en la que la razón en peso de bifenildicarboxilato de dimetilo : silibina o el derivado de silibina : co-tensioactivo : tensioactivo : aceite está en el intervalo de 1 : 0,3~33 : 10~150 : 5~100 : 1~50.
- 15 4. Composición de microemulsión oral según la reivindicación 1, en la que el co-tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en etanol, propilenglicol, polietilenglicol, carbonato de propileno, monoetil éter de dietilenglicol, polietilenglicol éter de alcohol tetrahidrofurfurílico, dimetil-isosorbida y una mezcla de los mismos.
5. Composición de microemulsión oral según la reivindicación 4, en la que el co-tensioactivo es monoetil éter de dietilenglicol.
- 20 6. Composición de microemulsión oral según la reivindicación 1, en la que el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en: aceites vegetales hidrogenados o naturales polioxietilenglicolados, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno; copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno; copolímeros en bloque de polioxietileno-polioxipropileno; dioctil-sulfosuccinato de sodio; laurilsulfato de sodio; fosfolípidos; mono o di-ésteres de ácidos grasos de propilenglicol; productos de transesterificación de triglicéridos de aceites vegetales naturales y polialquilenpolioles; mono, di o mono/di-glicéridos, ésteres de ácidos grasos de sorbitano; esteroides o derivados de los mismos; y una mezcla de los mismos.
- 25 7. Composición de microemulsión oral según la reivindicación 6, en la que el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en aceites vegetales hidrogenados o naturales polioxietilenglicolados, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano y una mezcla de los mismos.
- 30 8. Composición de microemulsión oral según la reivindicación 1, en la que el aceite se selecciona del grupo que consiste en: triglicéridos de ácidos grasos de cadena media; mono, di o mono/di-glicéridos; ésteres de alcoholes monovalentes de ácidos grasos; aceites animales o vegetales naturales; escualeno; ácido oleico; ácido linoleico; y una mezcla de los mismos.
- 35 9. Composición de microemulsión oral según la reivindicación 8, en la que el aceite se selecciona del grupo que consiste en triglicéridos de ácidos grasos de cadena media, mono, di o mono/di-glicéridos, ésteres de ácidos grasos y alcoholes monovalentes y una mezcla de los mismos.
10. Composición de microemulsión oral según la reivindicación 1, que forma micropartículas que tienen un tamaño de partícula promedio de menos de 1 µm en contacto con un medio acuoso.