

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 339**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/343** (2006.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2012 E 12170825 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2606883**

54 Título: **Usos de n-butilidénftalida en el tratamiento de una lesión hepática y en la mejora de la función hepática**

30 Prioridad:

**20.12.2011 US 201113331059**

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

**05.12.2017**

73 Titular/es:

**NATIONAL DONG HWA UNIVERSITY (100.0%)  
No. 1, Sec. 2, Da Hsueh Road Shoufeng  
Hualien 97401, TW**

72 Inventor/es:

**CHIOU, TZYU-WEN;  
HARN, HORNG-JYH y  
LIN, SHINN-ZONG**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 645 339 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

Usos de n-butilidnftalida en el tratamiento de una lesión hepática y en la mejora de la función hepática

**Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a nuevos usos de la n-butilidnftalida (abreviada como n-BP en lo sucesivo en el presente documento) en el tratamiento de una lesión hepática tal como la fibrosis hepática, la cirrosis hepática o la hepatitis, y en la mejora/el restablecimiento de la función hepática tras una función hepática adversamente afectada por una lesión hepática.

**Descripción de la técnica relacionada**

- 10 La fibrosis hepática o su forma más grave, la cirrosis, es una respuesta de las células hepáticas a una lesión extrínseca producida por una serie de ataques de virus, toxinas o metabolitos. La cirrosis es responsable de hasta 35 000 muertes al año en Estados Unidos, a menos que se pueda salvar la degeneración progresiva de la función hepática mediante un trasplante hepático. Histológicamente, la cirrosis se caracteriza por un depósito excesivo de matriz extracelular (es decir, fibrosis), que rodea a los nódulos hepatocelulares regenerativos.
- 15 Además del deterioro de la función hepática, estos nódulos son también un semillero para la formación del carcinoma hepatocelular. Clínicamente, la silimarina y la pentoxifilina (Trental) pueden reducir significativamente la mortalidad de pacientes con cirrosis hepática inducida por alcohol. Sin embargo, hay solo una eficacia dudosa en cuanto a atenuar la fibrosis hepática y mejorar la función hepática (Zhang y col., 2005)<sup>1</sup>. Por tanto, son importantes los medicamentos, alimentos o sustancias eficaces que puedan atenuar la progresión o inducir la regresión de la fibrosis hepática.
- 20

- La *Angelica sinensis* (conocida también como Dong Quai) está indicada para los trastornos menstruales, incluyendo los síntomas de la menopausia (Huntley y Ernst, 2003)<sup>2</sup>. También se ha usado ampliamente para afecciones tales como daño de la mucosa gástrica, lesión hepática, flujo sanguíneo miocárdico alterado y glomerulonefritis crónica (Yim y col., 2000, Ye y col., 2001a, Ye y col., 2001b)<sup>3-5</sup>. Asimismo, la Dong Quai se ha promovido en Estados Unidos para el tratamiento de diversos trastornos ginecológicos (Abebe, 2002)<sup>6</sup>.
- 25

Se han aislado seis compuestos principales de la *Angelica sinensis*:

- (E)-ligustilida, (Z)-ligustilida, n-butilidnftalida, ácido palmítico, b-sitosterol y ácido ferúlico. La n-butilidnftalida (n-BP, peso molecular: 188,22) y la ligustilida (K2; peso molecular: 190,23) son particularmente abundantes (Wang et al., 1998)<sup>7</sup>, exhibiendo la primera más potencia que la ligustilida. En ratas conscientes, la n-BP alivia la angina sin influir en la presión sanguínea o la frecuencia cardíaca (Ko y col., 1998, Chan y col., 2009)<sup>8-9</sup>. Previamente, los presentes inventores han demostrado que el extracto acetónico de *A. sinensis* inhibe la proliferación de células cancerosas *in vitro* (Cheng y col., 2004)<sup>10</sup> y que el extracto clorofórmico posteriormente obtenido de *A. sinensis* antagoniza células de tumor cerebral *in vivo* e *in vitro* (Tsai y col., 2006)<sup>11</sup>. Los presentes inventores han demostrado también los efectos antitumorales de la n-BP sobre el neuroblastoma, cáncer pulmonar, melanoma, teratoma, leucemia, cáncer de mama, y carcinoma hepatocelular *in vitro* y sobre tumores cerebrales GBM *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, hasta ahora, no hay un estudio para la n-BP contra la fibrosis hepática o la cirrosis.
- 30
- 35

- La fibrosis hepática es la consecuencia común de diferentes enfermedades hepáticas caracterizadas por el daño crónico del tejido hepático. Este proceso es una consecuencia de la activación crónica de las células estrelladas hepáticas (CEH), que lleva a la proliferación celular y al aumento del depósito de componentes de la matriz extracelular.
- 40

- Chen y col. (2008) enseñan el uso de la n-BP para el tratamiento del carcinoma hepatocelular. El documento EP 2 343 051 enseña también el uso de la n-BP para el tratamiento del carcinoma hepatocelular. Lin Yun-Lian y col. (2006) enseñan que un extracto de *Ligusticum chuanxiong* inhibía las células estrelladas hepáticas (CEH) y podía usarse para el tratamiento de la fibrosis hepática. Lee Ting-Fang y col. (2007) enseñan también que la fracción EtOAc de un extracto de *Ligusticum chuanxiong* inhibe las CEH. Según Yan R y col. (2005), los extractos de *Ligusticum chuanxiong* contienen n-BP.
- 45

**Sumario de la invención**

- En esta invención, basada en el nivel sérico de glutamato-oxalacetato-transaminasa (GOT), glutamato-piruvato-transaminasa (GPT), y bilirrubina y en el examen histológico (puntuación de Metavir), los presentes inventores han descubierto que la n-BP puede inhibir la inflamación del hígado, tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Además, usando la puntuación de Metavir en el examen macroscópico, la tinción con hematoxilina y eosina y la tinción histoquímica, los presentes inventores han demostrado que la n-BP puede disminuir las fibras de colágeno en el hígado y atenuar la regeneración de los nódulos llevando a la curación de la fibrosis hepática. Por último, basados en el tiempo de protrombina y el nivel de albúmina sérica que son indicadores de la función hepática, los resultados
- 50

de los presentes inventores indican que la n-BP puede restablecer la función hepática después de una lesión de las células hepáticas.

### **Breve descripción de las figuras**

- 5 FIG. 1a: Resultado del examen macroscópico del grupo de control (administración oral de aceite de oliva) y de la administración de 80 mg de n-BP frente a una fibrosis hepática inducida por la inyección de 200 mg/kg de TAA. Para inducir el daño hepático, para todos los grupos experimentales a excepción del grupo normal, se efectuó la inyección de 200 mg/kg de TAA una vez cada 3 días durante 8 semanas. Las fotografías n.º 91, n.º 92 y n.º 162 son fotografías de hígados de ratas experimentales sacrificadas tras la inyección de TAA durante 4 semanas. La
- 10 terapia mediante administración oral de varias concentraciones de BP o aceite de oliva (como control) en los grupos experimentales se inició desde la quinta semana y finalizó al término de la semana 8. La n.º 88 muestra el hígado del grupo de administración de aceite de oliva al término de la semana 8 (después de la ingestión de 4 semanas de aceite de oliva). La n.º 72, la n.º 78 y la n.º 79 muestran los hígados del grupo de administración de 80 mg de n-BP al término de la semana 8. Dos semanas después de la terapia (al término de la semana 10), las ratas experimentales se sacrificaron; La n.º 73, la n.º 74 y la n.º 77 muestran los hígados del grupo de administración de 80 mg de n-BP y la n.º 139 muestra el hígado del grupo de administración de aceite de oliva.
- 15 FIG. 1b: Tinción con hematoxilina y eosina de secciones del hígado de las ratas del grupo de control (administración de aceite de oliva) y del grupo de administración de 80 mg de n-BP frente a una fibrosis hepática inducida por la inyección de 200 mg/kg de TAA. La n.º 88 muestra la sección del hígado del grupo de administración de aceite de oliva al término de la semana 8 (después de la ingestión de 4 semanas de aceite de oliva). La n.º 72, la n.º 78 y la n.º 79 muestran secciones del hígado del grupo de administración de 80 mg de n-BP al término de la semana 8. Dos semanas después de la terapia (al término de la semana 10), las ratas experimentales se sacrificaron; La n.º 73, la n.º 74 y la n.º 77 muestran secciones del hígado del grupo de administración de 80 mg de n-BP y la n.º 139 muestra la sección del hígado del grupo de administración de aceite de oliva.
- 20 FIG. 1c: Tinción tricrómica de Masson de secciones del hígado de las ratas del grupo de control (administración de aceite de oliva) y del grupo de administración de 80 mg de n-BP frente a una fibrosis hepática inducida por la inyección de 200 mg/kg de TAA. La n.º 88 muestra la sección del hígado del grupo de administración de aceite de oliva al término de la semana 8 (después de la ingestión de 4 semanas de aceite de oliva). La n.º 72, la n.º 78 y la n.º 79 muestran secciones del hígado del grupo de administración de 80 mg de n-BP al término de la semana 8. Dos semanas después de la terapia (al término de la semana 10), las ratas experimentales se sacrificaron; La n.º 73, la n.º 74 y la n.º 77 muestran secciones del hígado del grupo de administración de 80 mg de n-BP y la n.º 139 muestra la sección del hígado del grupo de administración de aceite de oliva.
- 25 FIG. 2a: Resultado del examen macroscópico del grupo de control (administración oral de aceite de oliva) y de la administración de 500 mg de n-BP frente a una fibrosis hepática inducida por la inyección de 200 mg/kg de TAA. Las fotografías n.º 91, n.º 92 y n.º 162 son fotografías de hígados de ratas experimentales sacrificadas tras la inyección de TAA durante 4 semanas. La n.º 88 muestra el hígado del grupo de administración de aceite de oliva al término de la semana 8 (después de la ingestión de 4 semanas de aceite de oliva). La n.º 80, la n.º 81 y la n.º 82 muestran los hígados del grupo de administración de 500 mg de n-BP al término de la semana 8 (después de 4 semanas de ingestión de 500 mg/kg/día de n-BP). La n.º 83, la n.º 86 y la n.º 87 muestran los hígados del grupo de administración de 500 mg de n-BP dos semanas después de la terapia (al término de la semana 10) y la n.º 139 muestra el del grupo de administración de aceite de oliva.
- 30 FIG. 2b: Tinción con hematoxilina y eosina de secciones del hígado de las ratas del grupo de control (administración de aceite de oliva) y del grupo de administración de 500 mg de n-BP frente a una fibrosis hepática inducida por la inyección de 200 mg/kg de TAA. Las fotografías n.º 91, n.º 92 y n.º 162 son fotografías de secciones del hígado de ratas experimentales sacrificadas tras la inyección de TAA durante 4 semanas. La n.º 88 muestra la sección del hígado del grupo de administración de aceite de oliva al término de la semana 8 (después de la ingestión de 4 semanas de aceite de oliva). La n.º 80, la n.º 81 y la n.º 82 muestran secciones del hígado del grupo de administración de 500 mg de n-BP al término de la semana 8 (después de 4 semanas de ingestión de 500 mg/kg/día de n-BP). La n.º 83, la n.º 86 y la n.º 87 muestran secciones del hígado del grupo de administración de 500 mg de n-BP dos semanas después de la terapia (al término de la semana 10) y la n.º 139 muestra el del grupo de administración de aceite de oliva.
- 35 FIG. 2c: Tinción tricrómica de Masson de secciones del hígado de las ratas del grupo de control (administración de aceite de oliva) y del grupo de administración de 500 mg de n-BP frente a una fibrosis hepática inducida por la inyección de 200 mg/kg de TAA. Las fotografías n.º 91, n.º 92 y n.º 162 son fotografías de secciones del hígado de ratas experimentales sacrificadas tras la inyección de TAA durante 4 semanas. La n.º 88 muestra la sección del hígado del grupo de administración de aceite de oliva al término de la semana 8 (después de la ingestión de 4 semanas de aceite de oliva). La n.º 80, la n.º 81 y la n.º 82 muestran secciones del hígado del grupo de administración de 500 mg de n-BP al término de la semana 8 (después de 4 semanas de ingestión de 500 mg/kg/día de n-BP). La n.º 83, la n.º 86 y la n.º 87 muestran secciones del hígado del grupo de administración de 500 mg de n-BP dos semanas después de la terapia (al término de la semana 10) y la n.º 139 muestra el del grupo de administración de aceite de oliva.
- 40 FIG. 3: La puntuación de cantidad de fibrosis hepática (de acuerdo con el sistema de puntuación de Metavir) a las 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas y 10 semanas en cada grupo experimental: normal, inducción por TAA,
- 45
- 50
- 55
- 60

aceite de oliva, BP (80 mg/kg) y BP (500 mg/kg). Todos los datos se mostraron como la media con la d.t. Para la comparación de los diferentes tratamientos en dos grupos, los datos se analizaron usando el ensayo t de Student. Valores de  $p < 0,05$  se consideran significativos (\*), de  $p < 0,01$  se consideran altamente significativos (\*\*), y de  $p < 0,001$  se consideran extremadamente significativos (\*\*\*)

FIG. 4: La puntuación de cantidad de actividad hepática de acuerdo con el sistema de puntuación de Metavir a las 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas y 10 semanas en cada grupo experimental: normal, inducción por TAA, aceite de oliva, BP (80 mg/kg) y BP (500 mg/kg). Todos los datos se mostraron como la media con la d.t. Para la comparación de los diferentes tratamientos en dos grupos, los datos se analizaron usando el ensayo t de Student.

FIG. 5A: Valor bioquímico en plasma de la GOT sérica a las 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas y 10 semanas en cada grupo experimental: normal, inducción por TAA, aceite de oliva, BP (80 mg/kg) y BP (500 mg/kg). Todos los datos se mostraron como la media con la d.t. Para la comparación de los diferentes tratamientos en dos grupos, los datos se analizaron usando el ensayo t de Student.

FIG. 5B: Valor bioquímico en plasma de la GPT sérica a las 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas y 10 semanas en cada grupo experimental: normal, inducción por TAA, aceite de oliva, BP (80 mg/kg) y BP (500 mg/kg). Todos los datos se mostraron como la media con la d.t. Para la comparación de los diferentes tratamientos en dos grupos, los datos se analizaron usando el ensayo t de Student.

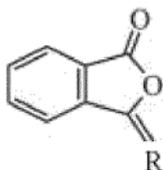
FIG. 6: Valor bioquímico en plasma de la bilirrubina total a las 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas y 10 semanas en cada grupo experimental: normal, inducción por TAA, aceite de oliva, BP (80 mg/kg) y BP (500 mg/kg). Todos los datos se mostraron como la media con la d.t. Para la comparación de los diferentes tratamientos en dos grupos, los datos se analizaron usando el ensayo t de Student.

FIG. 7: Valor bioquímico en plasma de la albúmina sérica a las 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas y 10 semanas en cada grupo experimental: normal, inducción por TAA, aceite de oliva, BP (80 mg/kg) y BP (500 mg/kg). Todos los datos se mostraron como la media con la d.t. Para la comparación de los diferentes tratamientos en dos grupos, los datos se analizaron usando el ensayo t de Student.

FIG. 8: Valor bioquímico en plasma del tiempo de protrombina a las 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas y 10 semanas en cada grupo experimental: normal, inducción por TAA, aceite de oliva, BP (80 mg/kg) y BP (500 mg/kg). Todos los datos se mostraron como la media con la d.t. Para la comparación de los diferentes tratamientos en dos grupos, los datos se analizaron usando el ensayo t de Student.

### **Descripción detallada de la invención**

Las enfermedades hepáticas crónicas y la cirrosis hepática son potencialmente mortales. Sin embargo, hay muy pocos fármacos disponibles para la prevención o el tratamiento eficaz de las mismas. Esta invención proporciona un nuevo uso de la n-butilidenftalida (n-BP) para inhibir/tratar la fibrosis hepática y la cirrosis hepática. En un aspecto de la presente invención, se proporciona la (n)-butilidenftalida que tiene la siguiente fórmula (I) como principio activo para su uso en el tratamiento de la fibrosis hepática, la cirrosis hepática, o la hepatitis, y/o en la mejora de la función hepática en un sujeto:



(I)

en la que R es =  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , y la n-butilidenftalida (I) es la forma E, la forma Z o una mezcla de las mismas, tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

La (n)-butilidenftalida se puede administrar por vía oral, subcutánea, intravenosa, mediante aplicación dérmica o las formas de liberación lenta.

Preferentemente, la función hepática mejorada comprende una disminución del tiempo de protrombina o un aumento del nivel de albúmina sérica.

Preferentemente, la (n)-butilidenftalida se usa en una dosificación equivalente a de aproximadamente 8 mg a aproximadamente 500 mg de (n)-butilidenftalida por kilogramo de peso corporal al día.

Preferentemente, el principio activo se sintetiza y, de modo alternativo, se puede extraer y aislar de una planta. Más preferentemente, la planta es *Angelica sinensis* o *Ligusticum chuanxiong*.

Preferentemente, el principio activo está contenido como ingrediente principal en un extracto de *Angelica sinensis* o *Ligusticum chuanxiong*.

Preferentemente, el principio activo se administra a un sujeto por vía oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea o en una forma de liberación lenta.

Preferentemente, la lesión hepática es causada por un agente químico, un microorganismo, un agente físico, un alcohol, un virus o una obstrucción biliar congénita.

Se usó un modelo en rata de daño hepático crónico inducido por tioacetamida a fin de demostrar la factibilidad de la presente invención. Se inyectaron 5 ml/kg de tioacetamida (TAA) por vía intraperitoneal a ratas Wistar cada tres días durante ocho semanas a fin de inducir el daño hepático. La terapia se llevó a cabo partiendo de la quinta semana durante la inducción con tioacetamida. Se administraron por vía oral 80 mg/kg/día o 500 mg/kg/día de n-BP a ratas experimentales durante cuatro semanas. En comparación con el grupo de control (sin terapia), el análisis del índice de función hepática, que incluye GOT, GPT, albúmina, bilirrubina total y tiempo de protrombina, revela una recuperación significativa del daño hepático en los grupos de terapia con n-BP. Los exámenes histopatológicos muestran que, en los grupos de terapia, la inflamación y la acumulación de fibras de colágeno se reducen significativamente. Basándose en estos resultados, se infiere que la administración oral de n-BP puede facilitar la recuperación de la función hepática a partir de un daño hepático crónico y tiene potencial en la aplicación clínica para el tratamiento de la fibrosis hepática.

La tecnología detallada y las realizaciones preferentes implementadas para la invención objeto se describen en los siguientes párrafos que acompañan a los dibujos adjuntos a fin de que el experto en la materia pueda apreciar bien las características de la invención reivindicada.

#### **Establecimiento del modelo de fibrosis hepática crónica y evaluación de la función hepática**

En este estudio, se obtuvieron ratas Wistar de LASCO CO., LTD (Taiwán). Todos los procedimientos siguieron las directrices éticas del Comité institucional para el cuidado y uso de animales de la Universidad de Dong-Hwa, Taiwán y fueron aprobados por el mismo.

Para establecer el modelo de fibrosis hepática crónica en ratas, se usaron ratas Wistar macho adultas ( $320 \pm 20$  g) a las se inyectaron por vía intraperitoneal 200 mg/kg de TAA (Sigma-Aldrich) una vez cada 3 días durante 8 semanas como modelo de fibrosis hepática (78 ratas). En el grupo normal (24 ratas), se usó solución salina normal en lugar de TAA. Al término de 4, 6, 8 y 10 semanas (es decir, el día 28, el día 42, el día 56 y el día 70, respectivamente), estas ratas fueron sacrificadas y se tomaron muestras de sangre cardíaca. Estas muestras se analizaron con un analizador bioquímico (Integra 800; Roche, Holliston, MA, EE.UU.) para medir el índice de función hepática que incluía la glutamato-oxalacetato-transaminasa (GOT), la glutamato-piruvato-transaminasa (GPT), la albúmina sérica, la bilirrubina total y el tiempo de protrombina.

Tras esto, se analizó también la histopatología de muestras de tejido hepático obtenidas de las ratas sacrificadas. Las muestras de tejido hepático se fijaron en formaldehído al 3,7 % y se embebieron después en parafina. Se tiñeron secciones de 3  $\mu$ m en serie de los tejidos embebidos con hematoxilina y eosina o con tinción tricrómica de Masson. La fibrosis hepática es la acumulación excesiva de colágeno en el hígado y, por tanto, la acumulación de colágeno es un índice importante para evaluar la fibrosis hepática. La tinción tricrómica de Masson se usa con frecuencia para identificar aumentos del tejido de colágeno en un hígado fibrótico. Para la tinción tricrómica de Masson, se colocaron las muestras seccionadas en solución de Bouin (Sigma-Aldrich) a 56 °C durante 1 h y después se tiñeron secuencialmente con las siguientes soluciones: solución de hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich) durante 5 min, solución de escarlata de Biebrich – fucsina ácida (Sigma-Aldrich) durante 15 min, ácido fosfomolibdico-ácido fosfotúngstico (Sigma-Aldrich) durante 15 min, y azul de anilina (Sigma-Aldrich) durante 5 min.

#### **Administración de n-BP oral al experimento del modelo de fibrosis hepática**

Se dividieron en 4 grupos de forma aleatoria 78 ratas con hígados fibróticos inducidos por TAA. Para el grupo 1 (grupo TAA), había 24 ratas que no recibieron terapia. Las 58 ratas restantes se dividieron en tres grupos: Grupo de control, grupo tratado con N-BP I (grupo BP 80 mg/kg) y grupo tratado con N-BP II (grupo BP 500 mg/kg). Para estos tres grupos, desde el inicio de la semana 5 hasta el término de la semana 8, se administró por vía oral a las ratas aceite de oliva, n-BP (80 mg/Kg/día), y n-BP (500 mg/Kg/día) una vez al día, en los que la dosificación fue de 1 ml de aceite de oliva por kilogramo de peso corporal (grupo de control), 1 ml de una solución de 80 mg/ml de n-BP en aceite de oliva por kilogramo de peso corporal (grupo BP 80 mg/kg), y 1 ml de una solución de 500 mg/ml de n-BP en aceite de oliva por kilogramo de peso corporal (grupo BP 500 mg/kg), respectivamente. El n-BP se adquirió en Alfa Aesar®, cat. A10353.

Al término de 6, 8 y 10 semanas, las ratas de cada grupo fueron sacrificadas y se tomaron muestras de sangre cardíaca. Estas muestras se analizaron con un analizador bioquímico (Integra 800; Roche, Holliston, MA, EE.UU.) para medir el índice de función hepática que incluía la glutamato-oxalacetato-transaminasa (GOT), la glutamato-piruvato-transaminasa (GPT), la albúmina sérica, y el tiempo de protrombina. Tras esto, se analizó también la histopatología de muestras de tejido hepático obtenidas de las ratas sacrificadas. Las muestras de tejido hepático se fijaron en formaldehído al 3,7 % y se embebieron después en parafina. Se tiñeron secciones de 3  $\mu$ m en serie de los tejidos embebidos con hematoxilina y eosina o con tinción tricrómica de Masson, tal como se ha descrito anteriormente.

#### **Administración oral de n-BP frente a una fibrosis hepática inducida por la inyección de 200 mg/kg de TAA en**

**comparación con el grupo de control (aceite de oliva) a partir del examen macroscópico, la sección de hematoxilina-eosina, y la tinción tricrómica de Masson para evaluar la eficacia de atenuación de la fibrosis hepática:**

Las Figs. 1a y 2a muestran el examen macroscópico de los hígados de las ratas en el grupo de control y en los grupos de terapia. Se debe observar el color, el volumen del hígado; si existe exudación, engrosamiento o conglutinación; si la superficie del hígado es lisa o nodular. El hígado normal es de color marrón rojizo con una superficie lisa; se puede ver que la fotografía n.º 73 y la n.º 78 de la Fig. 1a (el grupo BP 80 mg/kg) y la n.º 81 y la n.º 87 de la Fig. 2a (el grupo BP 500 mg/kg) llegan a ser incluso mejores como la morfología normal del hígado. El hígado aumenta de tamaño con una superficie granular y una textura firme, si está lesionado, como el del grupo de control (Fig. 1a, 2a: n.º 88, 139).

La tinción con hematoxilina y eosina de secciones de tejido hepático de rata dañado indica que se observaron vacuolización del tejido, necrosis y degeneración de los núcleos celulares en las secciones de hígado de ratas con fibrosis hepática inducida por tioacetamida del grupo de control (Fig. 1b, 2b: n.º 88, 139). Los datos histopatológicos sugieren también que la administración de n-BP mejora el daño hepático; la recuperación de la degeneración del tejido y la vacuolización era evidente en los grupos de n-BP al término de las 8 semanas y las 10 semanas (Fig. 1b: n.º 72, 78, 79, 73, 74, 77 y Fig. 2b: n.º 80, 81, 82, 83, 86, 87), mientras que el grupo de control (aceite de oliva) muestra aún una inflamación y una necrosis graves (Fig. 1b, 2b: n.º 88, 139).

La tinción tricrómica de Masson revela una grave acumulación de colágeno en los hígados de las ratas con fibrosis hepática. La degradación del colágeno se descubrió a las 8 semanas (Fig. 1c: n.º 72, 78, 79; Fig 2c: n.º 80, 81, 82) y 10 semanas en los grupos tratados con n-BP (Fig. 1c: n.º 73, 74, 77; Fig. 2c: n.º 83, 86, 87), mientras que el grupo de control muestra aún una acumulación sustancial de colágeno (Fig. 1c, Fig. 2c: n.º 88, 139).

La puntuación de la fibrosis que se generó usando el grado de fibrosis (tabla 1) es menor en los grupos tratados con n-BP que en el grupo de control los días 42, 56 y 70 (Fig. 3). La tinción tricrómica de Masson para el colágeno muestra que no hay casi acumulación de colágeno en los grupos tratados con n-BP los días 42, 56 y 70 (grado de fibrosis 1-2) (Fig. 3) mientras que el grupo de control muestra aún una cantidad significativa de acumulación de colágeno los días 42, 56 y 70 (grado de fibrosis 3-4) (Fig. 3).

Las puntuaciones de la actividad inflamatoria (tabla 1) se examinaron (Fig. 4). Estos descubrimientos sugieren que se produce una mejora de la recuperación del hígado dañado después de 2 semanas de tratamiento con n-BP.

Tabla 1 Puntuación METAVIR para fibrosis hepática (F) y actividad inflamatoria (A)

Puntuación	Descripción
F0	Sin fibrosis
F1	Fibrosis portal sin tabiques
F2	Fibrosis portal con unos pocos tabiques
F3	Numerosos tabiques sin cirrosis
F4	Cirrosis
Puntuación	Descripción
A0	Sin actividad
A1	Actividad leve
A2	Actividad moderada
A3	Actividad intensa

**Administración oral de n-BP frente a una fibrosis hepática inducida por la inyección de 200 mg/kg de TAA en comparación con el grupo de control (aceite de oliva) a partir de la SGOT, la SGPT, y la bilirrubina para evaluar la eficacia de atenuación de la actividad inflamatoria del hígado:**

En los grupos de ratas con fibrosis hepática, los niveles séricos de GOT, GPT y bilirrubina total, en comparación con el grupo normal, aumentan pronunciadamente al término de la semana 4 (antes de los tratamientos), indicando un daño hepático (Fig. 5A, Fig. 5B y Fig. 6).

En los dos grupos tratados con n-BP, los niveles de GOT y GPT disminuyen hasta valores casi normales al término de la semana 10, mientras que en el grupo de control siguen siendo todavía significativamente mayores que los del grupo normal (Fig. 5A, y Fig. 5B). Tal como se muestra en la Fig. 6, los niveles séricos de bilirrubina total en ambos grupos tratados con n-BP disminuyen al término de la semana 6 (dos semanas después de los tratamientos) y siguen disminuyendo hasta el término de la semana 10, mientras que el nivel sérico de bilirrubina total en el grupo de control no muestra una disminución hasta el término de la semana 8. Al término de la semana 10, los niveles

séricos de bilirrubina total en ambos grupos tratados con n-BP son significativamente menores que los del grupo de control. La ingestión oral de n-BP puede atenuar la actividad inflamatoria del hígado a la vista de estos datos.

5 **Administración oral de n-BP frente a una fibrosis hepática inducida por la inyección de 200 mg/kg de TAA en comparación con el grupo de control (aceite de oliva) a partir del nivel de albúmina y el tiempo de protrombina para evaluar la eficacia del restablecimiento de la función hepática.**

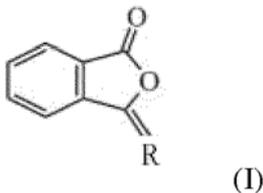
10 Desde el inicio de la inyección de TAA hasta el término de las 8 semanas, el daño hepático inducido por la inyección de TAA disminuye la albúmina (de  $4,04 \pm 0,27$  a  $3,62 \pm 0,33$  g/dl) y aumenta significativamente el tiempo de protrombina (de  $10,9 \pm 0,32$  a  $12,6 \pm 0,78$  s) en la sangre del grupo TAA, tal como se muestra en las Figs. 7 y 8. Los resultados bioquímicos en estos experimentos son consistentes con trabajos anteriores (Zhao y col. 2005, Abdel Aziz y col., 2007, Dai y col., 2009, Lin y col., 2010)<sup>12-15</sup>, sugiriendo una reducción significativa de la función hepática en estas ratas experimentales.

15 El nivel de albúmina aumenta en los grupos tratados con n-BP al término de la semana 6 y de la semana 8 (dos y cuatro semanas después de los tratamientos); sin embargo, el grupo de control muestra lo contrario, tal como se muestra en la Fig. 7. Los niveles de albúmina sérica en los grupos tratados con n-BP se han recuperado en mayor grado que en el grupo de control ( $3,62 \pm 0,33$  frente a  $4,35 \pm 0,47$ ) al término de la semana 10. El tiempo de protrombina en el grupo de control y en los dos grupos tratados con n-BP disminuye desde el inicio de la semana 6. El tiempo de protrombina al término de la semana 10 en los dos grupos tratados con n-BP disminuye hasta aproximarse al del grupo normal; sin embargo, el grupo de control tiene todavía un tiempo de protrombina más largo en comparación con el del grupo normal, tal como se muestra en la Fig. 8

20 El restablecimiento del tiempo de protrombina y los niveles de albúmina sérica sugieren que 2 o 3 semanas después del tratamiento con n-BP, se regenera la masa de hígado funcional.

**REIVINDICACIONES**

1. (N)-butilidenftalida que tiene la siguiente fórmula (I) como principio activo para su uso en el tratamiento de fibrosis hepática, cirrosis hepática, o hepatitis, o para su uso en la mejora de la función hepática en un sujeto



- 5 en la que R es = CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, y la n-butilidenftalida (I) es la forma E, la forma Z o una mezcla de las mismas.
2. (N)-butilidenftalida para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la (N)-butilidenftalida se usa en una dosificación equivalente a de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 500 mg de (n)-butilidenftalida por kilogramo de peso corporal al día.
- 10 3. (N)-butilidenftalida para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la (N)-butilidenftalida se extrae y se aísla de una planta.
4. (N)-butilidenftalida para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la planta es *Angelica sinensis* o *Ligusticum chuanxiong*.
5. (N)-butilidenftalida para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la (N)-butilidenftalida se usa mediante administración al sujeto por vía oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea o en una forma de liberación lenta.
- 15 6. (N)-butilidenftalida para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la función hepática mejorada comprende una disminución del tiempo de protrombina o un aumento del nivel de albúmina sérica.

Fig. 1a

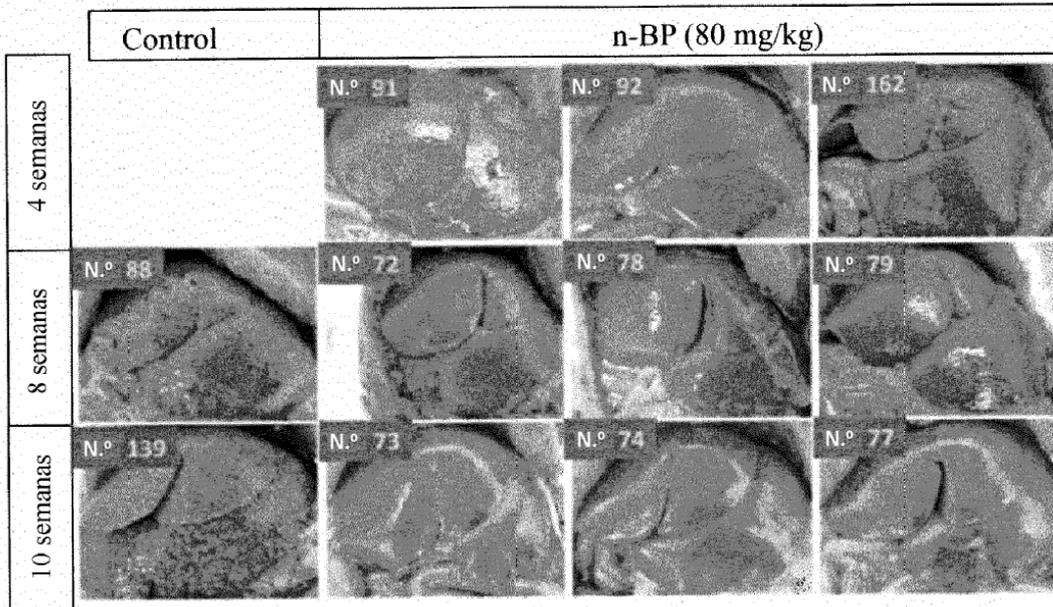


Fig. 1b

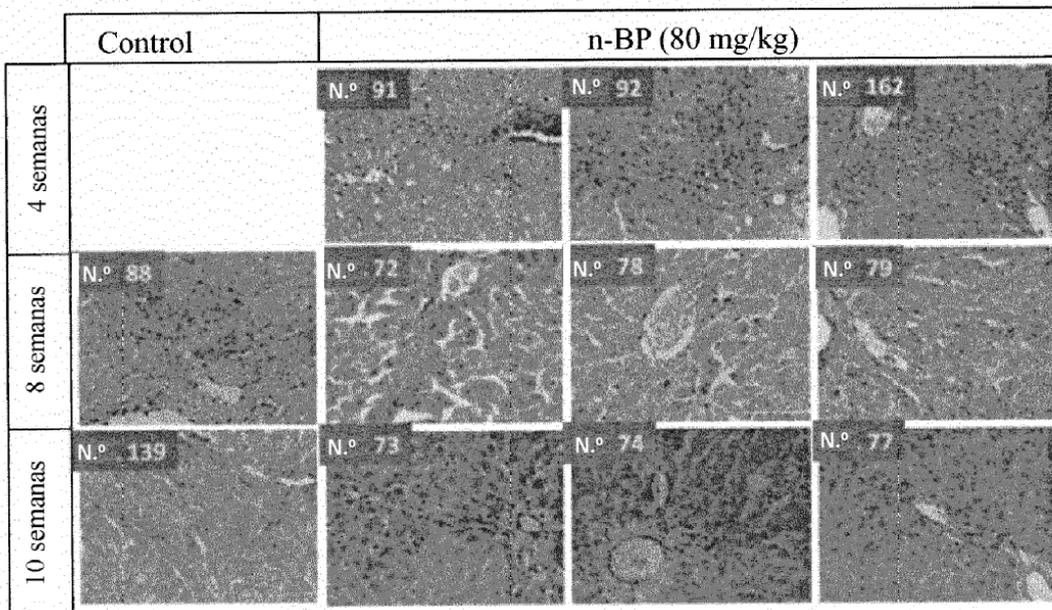


Fig. 1c

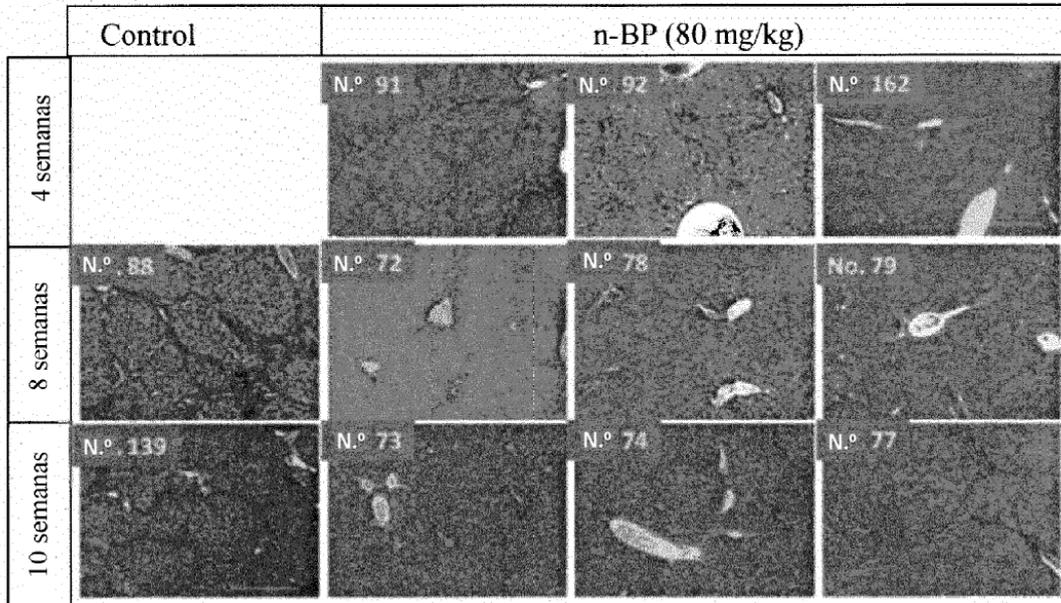


Fig. 2a

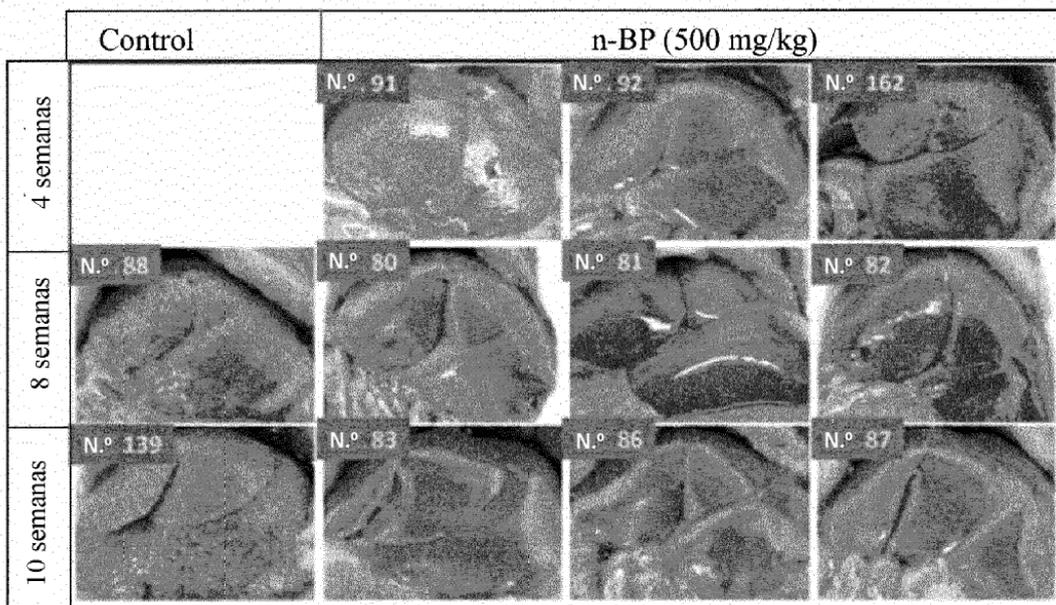


Fig. 2b

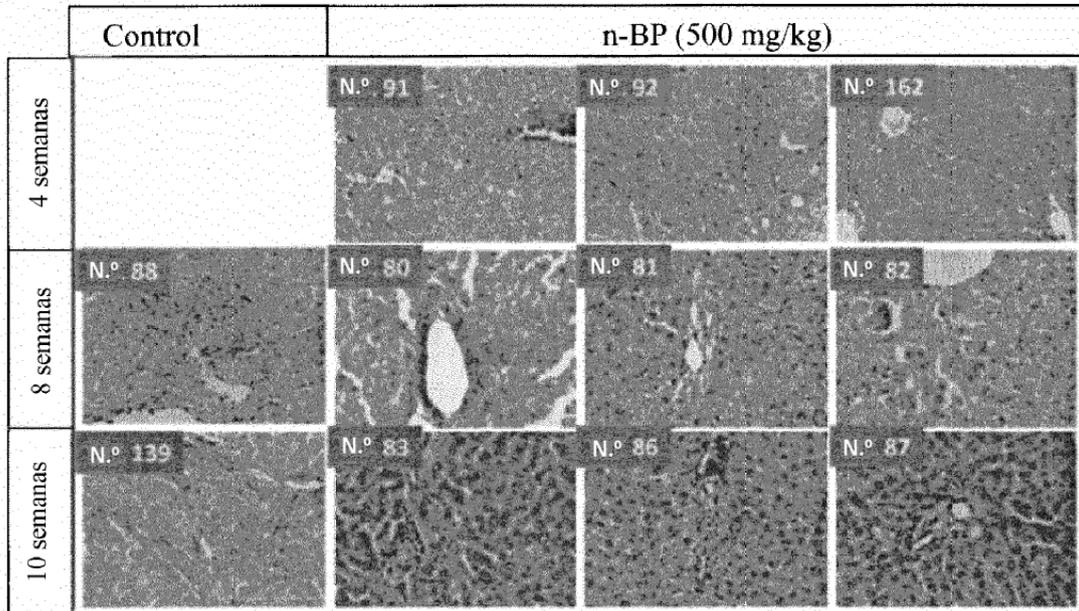


Fig. 2c

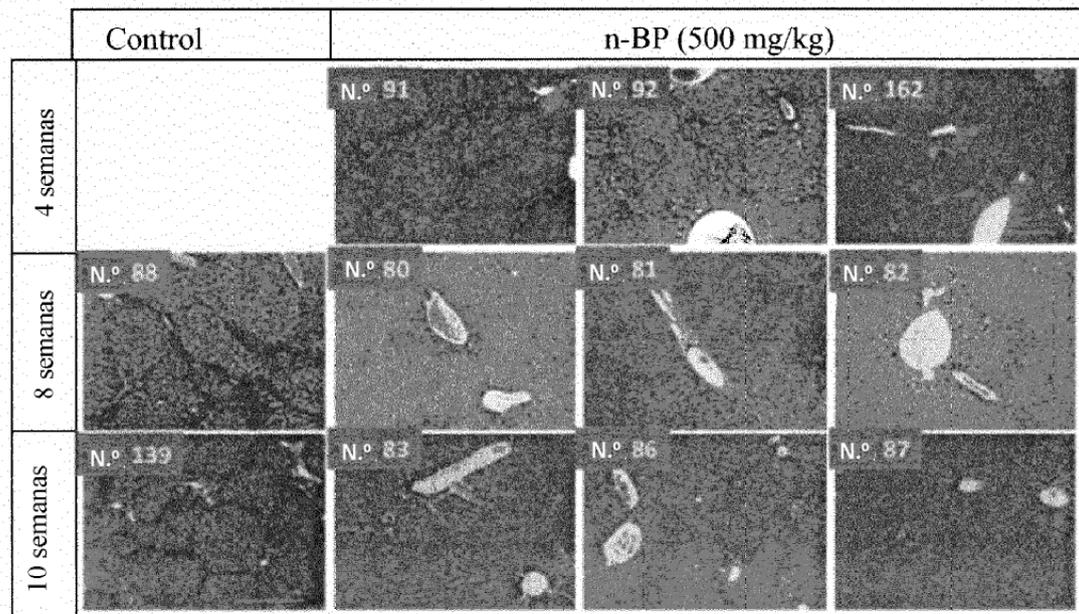


Fig. 3

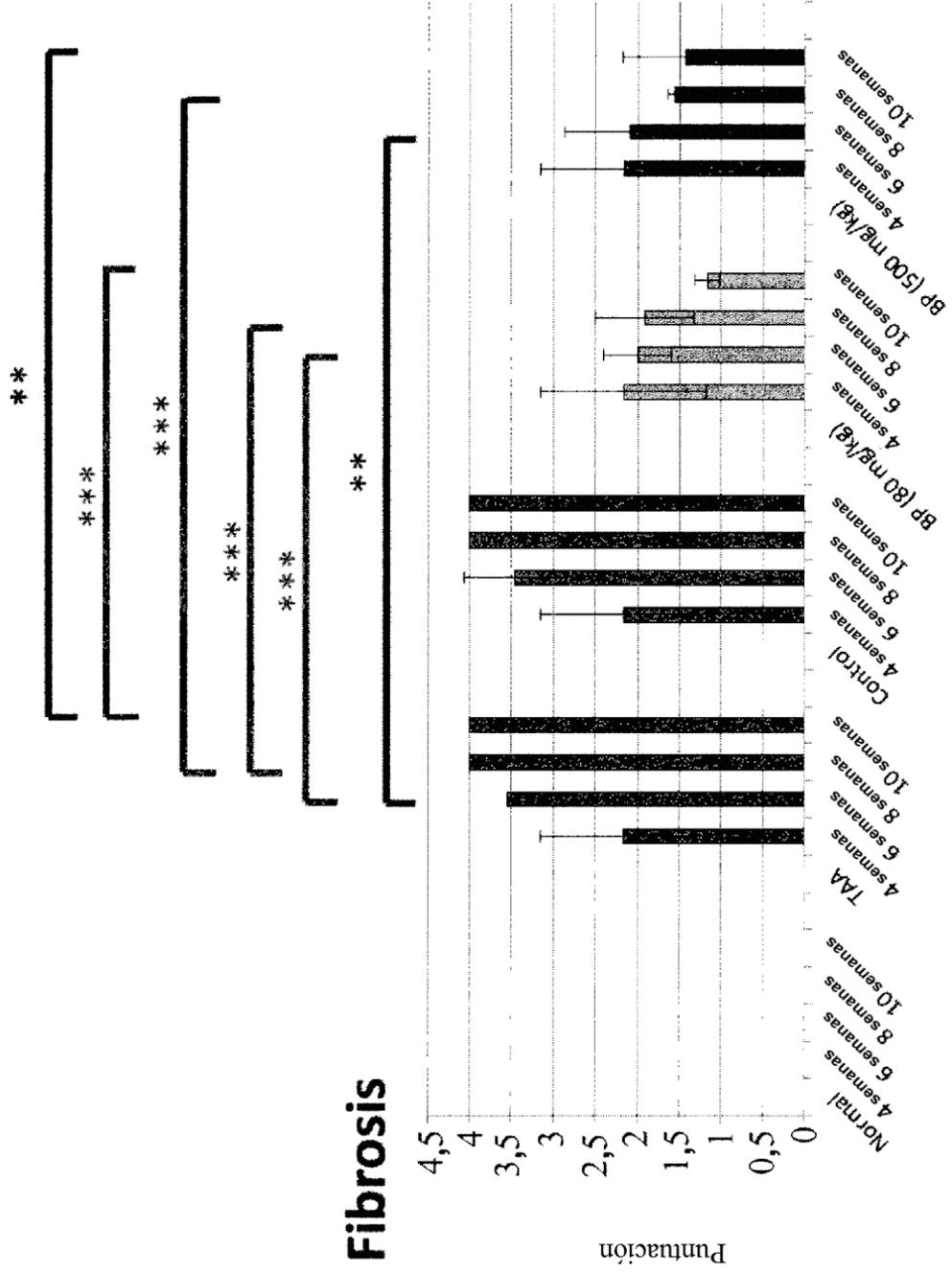


Fig. 4

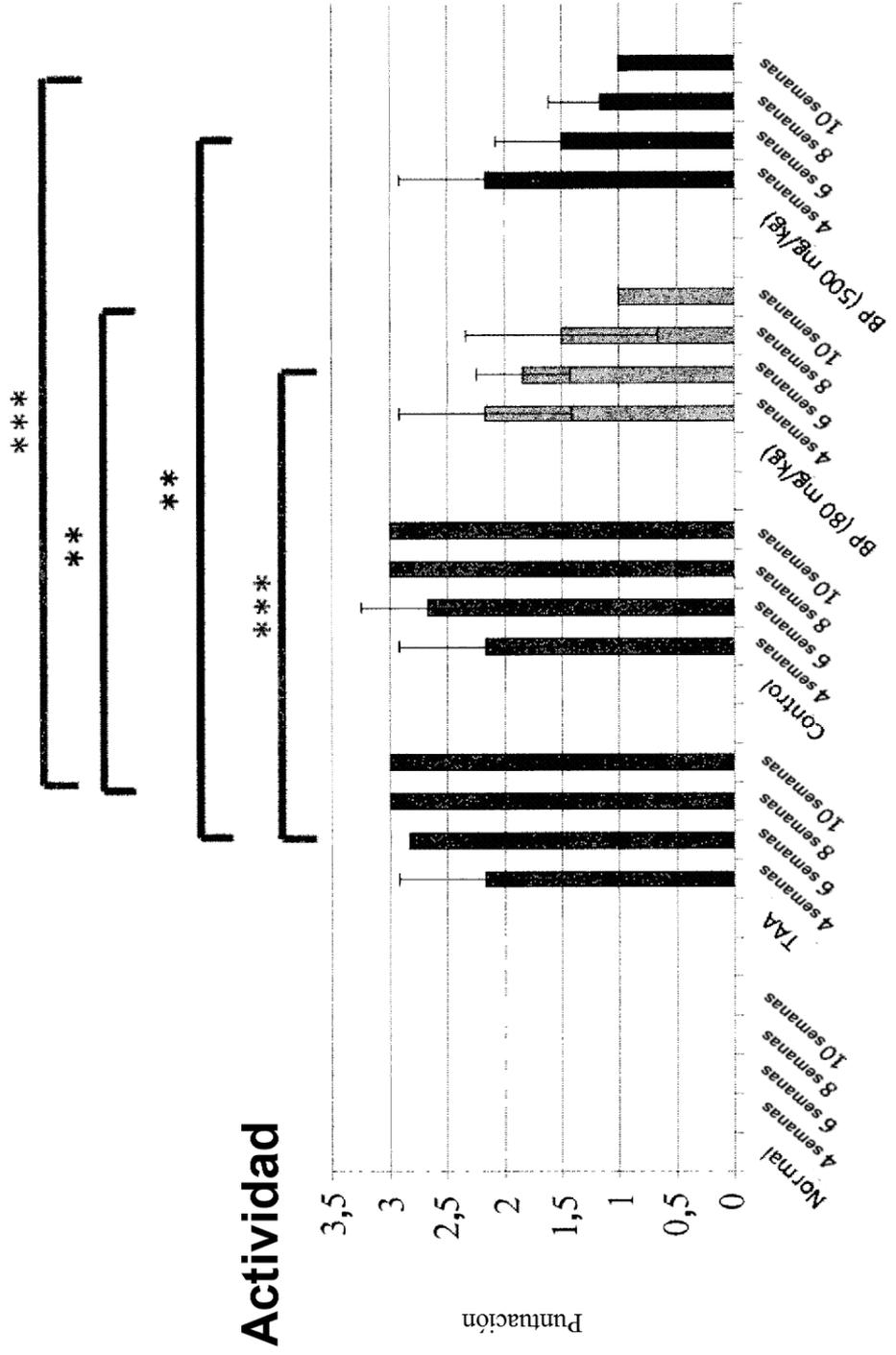


Fig. 5A

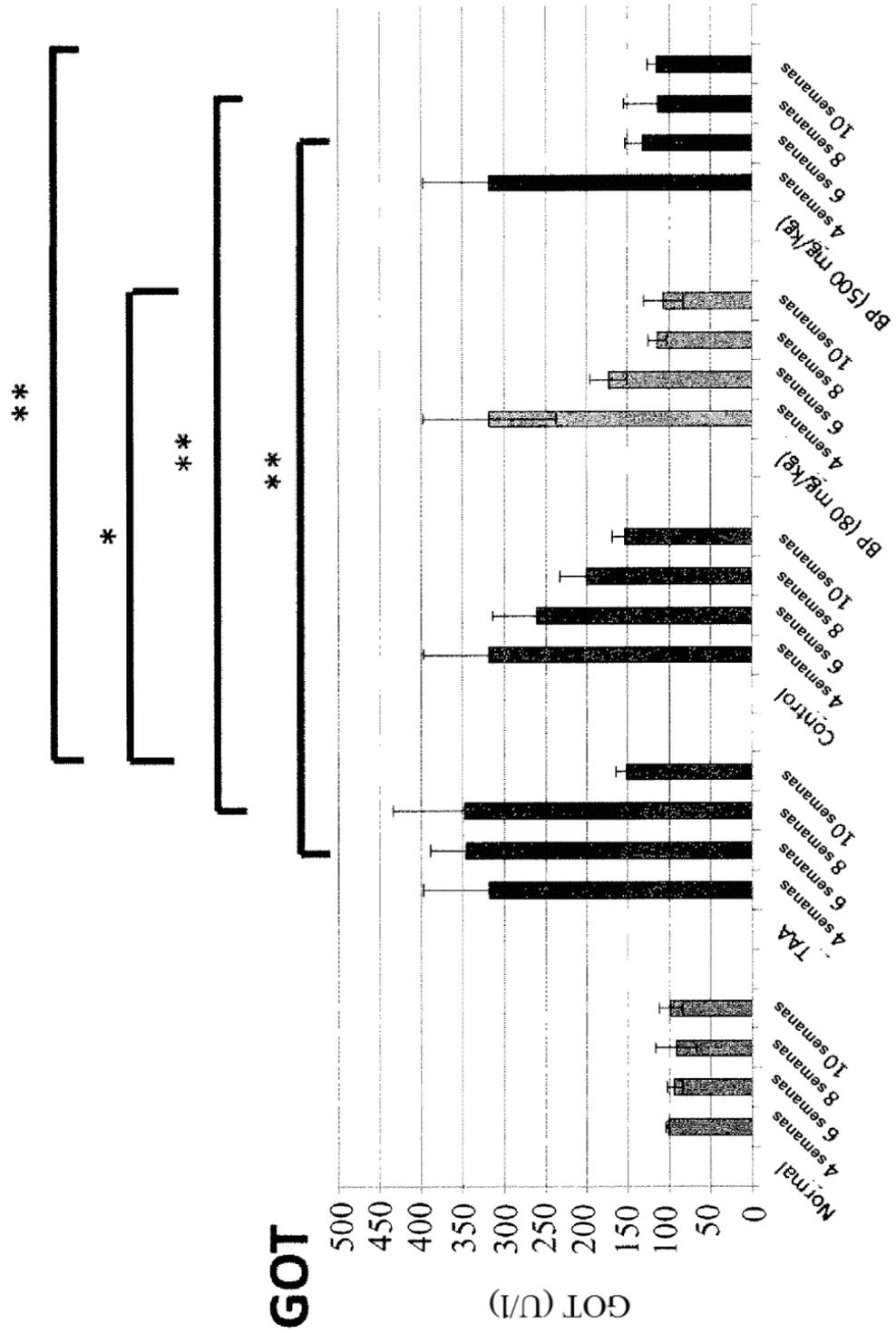


Fig. 5B

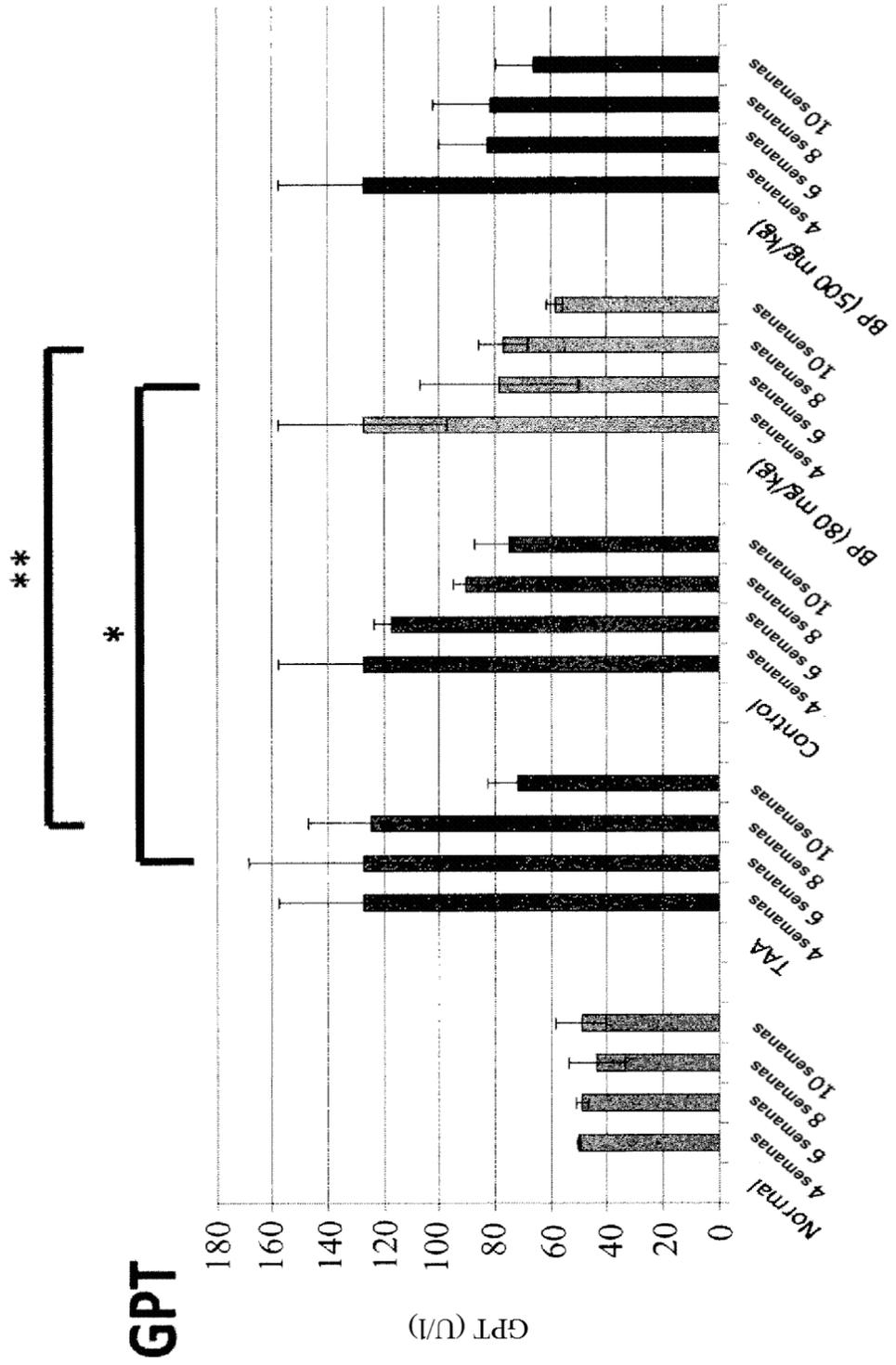




Fig. 7

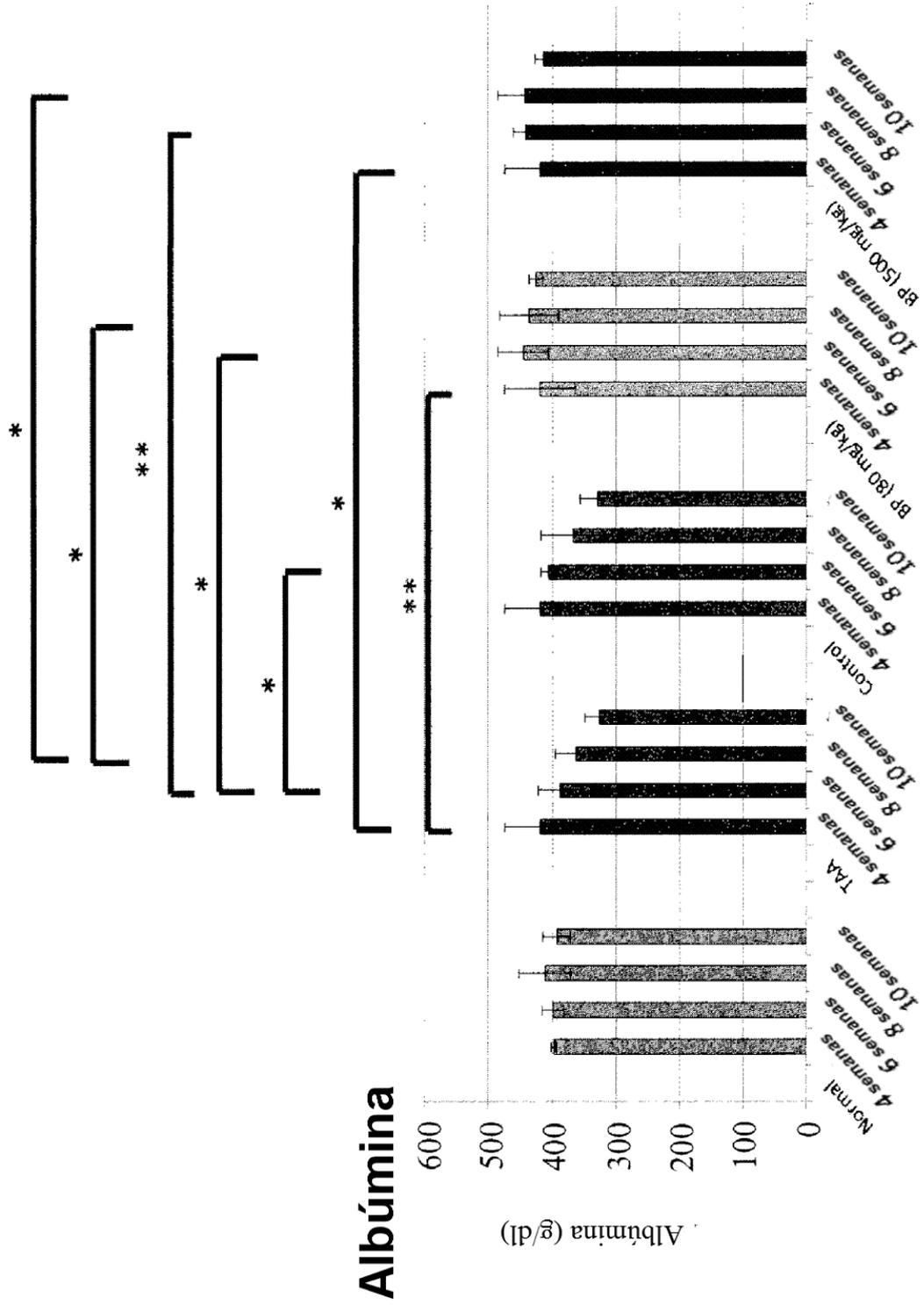


Fig. 8

