

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 785**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/352** (2006.01)

**C07D 311/62** (2006.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

**A61P 31/12** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2011** **PCT/CN2011/072045**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012** **WO12126178**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2011** **E 11861553 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018** **EP 2689777**

54 Título: **Composición farmacéutica para inducir la regeneración hepática**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.05.2018**

73 Titular/es:

**INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH  
INSTITUTE (100.0%)  
No. 195, Sec. 4, Chung Hsing Road  
Chutung, Hsinchu 310, TW**

72 Inventor/es:

**CHANG, SHAU-FENG;  
MA, CHUN-HSIEN;  
YANG, KUO-YI;  
LIN, SHYH-HORNG;  
LIN, CHIEN-TUNG y  
HUANG, KAI-WEN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 668 785 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para inducir la regeneración hepática

Campo técnico

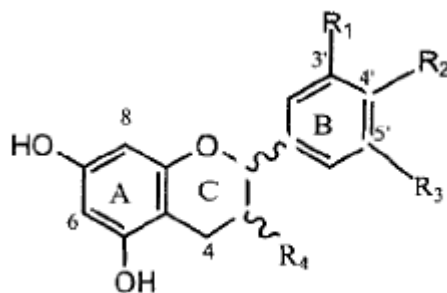
La divulgación se refiere a una composición farmacéutica, y más particularmente, a una composición farmacéutica para promover la regeneración de hígado dañado.

Antecedentes

El carcinoma hepatocelular (HCC, cáncer de hígado) ocupó el quinto lugar entre las causas de muerte del cáncer en el mundo en los hombres, el octavo en las mujeres. HCC es casi indetectable en la etapa inicial. Por lo tanto, el retraso del mejor momento del tratamiento ocurre todo el tiempo. Clínicamente, la cirugía de hepatectomía o el trasplante de hígado son los mejores métodos para el tratamiento de HCC. Sin embargo, dado que la mayoría de los pacientes con HCC han sido diagnosticados en etapa tardía, por lo tanto, solo el 15% de los pacientes pueden ser tratados mediante cirugía de hepatectomía, sin embargo, su tasa de recuperación es inferior al 5%. Además, se pueden utilizar otros métodos de tratamiento que incluyen la quimioembolización arterial transcatéter (TACE), la ablación por radiofrecuencia (RFA) y la radioterapia, sin embargo, su tasa de recaída es superior al 80%. Cuando los pacientes con síntomas clínicos son diagnosticados con HCC, el tiempo de supervivencia promedio de los mismos es solo de alrededor de 6 meses, a la luz de esto, no solo la tasa de mortalidad por HCC es alta, sino que su pronóstico es muy pobre. Actualmente, la eficacia de los medicamentos de quimioterapia comunes de HCC, por ejemplo, Fluorouracilo, Pirarubicina, Oxaliplatino, Cisplatino, etc., es limitada. El nuevo fármaco de terapia dirigida Nexavar® (Sorafenib) como inhibidores de quinasas múltiples ha sido aprobado para el estadio avanzado de HCC o HCC primario. Nexavar mejora la supervivencia en HCC. En 2008, la comercialización global del tratamiento del cáncer es de \$ 53.1 mil millones (Nature Review in Cancer) y la comercialización del tratamiento del cáncer de hígado es de aproximadamente \$ 2.5 mil millones. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de HCC es una necesidad no satisfecha en la clínica.

Resumen

Una realización de la invención proporciona una composición farmacéutica para promover la regeneración de hígado dañado, que incluye: una proantocianidina con una cantidad eficaz; y un portador o sal farmacéuticamente aceptable, en la que las unidades monoméricas de la proantocianidina tienen la siguiente fórmula:

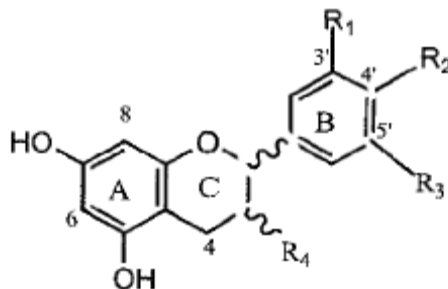


En la fórmula, cuando R<sub>1</sub> es OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> es OH y R<sub>3</sub> es H, cuando R<sub>1</sub> es OH, R<sub>2</sub> es H y R<sub>3</sub> es H, cuando R<sub>1</sub> es OH, R<sub>2</sub> es OH y R<sub>3</sub> es H, o cuando R<sub>1</sub> es OH, R<sub>2</sub> es OH y R<sub>3</sub> es OH, y R<sub>4</sub> es 3-(α)-OH, 3-(β)-OH, 3-(α)-O-azúcar o 3-(β)-O-azúcar.

La composición farmacéutica (BEL-X) se encuentra después de pruebas experimentales que se pueden aplicar al tratamiento de diversas enfermedades hepáticas, que incluyen (1) cáncer de hígado causado por virus de hepatitis B crónica o infección por virus de hepatitis C. La composición farmacéutica (BEL-X) se puede usar sola o usar como agentes adyuvantes para otros diversos métodos de tratamiento, que pueden mejorar la función hepática de los pacientes con HCC, reducir la progresión de HCC, aumentar la tasa operable y la tasa de éxito de la cirugía de pacientes con HCC, reducir la tasa de recurrencia postoperatoria, aumentar la tasa de supervivencia y prolongar el tiempo de supervivencia de los pacientes con HCC, además, mejorar la calidad de vida de los pacientes con HCC. (2) La composición farmacéutica (BEL-X) se puede usar sola o usar en combinación con otros fármacos de tratamiento clínico para tratar pacientes con fibrosis hepática. (3) La composición farmacéutica (BEL-X) se puede usar sola o usar en combinación con otros fármacos de tratamiento clínico para tratar pacientes con hígado graso, así como también mejorar las funciones hepáticas para prevenir la cirrosis hepática y el HCC.

A saber, la divulgación es como se describen los puntos a continuación.

1. Una composición farmacéutica para promover la regeneración de hígado dañado, que comprende: una proantocianidina con una cantidad eficaz, la unidad monomérica de la proantocianidina que tiene la siguiente fórmula:



- 5 en la que, cuando  $R_1$  es  $OCH_3$ ,  $R_2$  es  $OH$  y  $R_3$  es  $H$ , cuando  $R_1$  es  $OH$ ,  $R_2$  es  $H$  y  $R_3$  es  $H$ , cuando  $R_1$  es  $OH$ ,  $R_2$  es  $OH$  y  $R_3$  es  $H$ , o cuando  $R_1$  es  $OH$ ,  $R_2$  es  $OH$  y  $R_3$  es  $OH$ , y  $R_4$  es 3-( $\alpha$ )- $OH$ , 3-( $\beta$ )- $OH$ , 3-( $\alpha$ )- $O$ -azúcar o 3-( $\beta$ )- $O$ -azúcar; y un portador o sal farmacéuticamente aceptable.
2. La composición farmacéutica para promover la regeneración de hígado dañado como se describe en el punto 1, en la que las unidades monoméricas de la proantocianidina están unidas entre sí mediante enlaces C4-C8, enlaces C4-C6 o enlaces C2-O7.
3. La composición farmacéutica para promover la regeneración de hígado dañado como se describe en el punto 1, en la que la proantocianidina tiene un grado de polimerización que varía de 2 a 30.
4. La composición farmacéutica para promover la regeneración de hígado dañado como se describe en el punto 1, en la que las unidades monoméricas de la proantocianidina comprenden isómeros ópticos R o S en C2, C3 o C4.
5. La composición farmacéutica para promover la regeneración de hígado dañado como se describe en el punto 1, en la que las unidades monoméricas de la proantocianidina comprenden compuestos flavonoides.
6. La composición farmacéutica para promover la regeneración de hígado dañado como se describe en el punto 5, en la que los compuestos flavonoides comprenden catequina, epicatequina, epiafzetequina, galocatequina, galloepicatequina, epigallocatequina, flavonoles, flavandioles, leucocianidinas o procinidinas.
7. La composición farmacéutica para promover la regeneración de hígado dañado como se describe en el punto 1, en la que la unidad monomérica de la proantocianidina comprende flavan-3-ol.
8. La composición farmacéutica para promover la regeneración de hígado dañado como se describe en el punto 1, en la que la proantocianidina se extrae de una planta.
9. La composición farmacéutica para promover la regeneración de hígado dañado como se describe en el punto 8, en la que la planta comprende plantas de Ericaceae, Rosaceae, Pinaceae, Vitaceae o Urticaceae.
10. La composición farmacéutica para promover la regeneración de hígado dañado como se describe en el punto de 9, en la que la planta de Urticaceae comprende Boehmeria nivea L. Gaud.

Una descripción detallada se proporciona en las siguientes realizaciones con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

- 30 La divulgación se puede entender más completamente leyendo la descripción detallada posterior y ejemplos con referencias hechas al dibujo adjunto, en el que:

Las figuras 1a-1f representan 3-flavanol, 3,4-flavanol, catequina y epicatequina;

Las figuras 2a-2e representan espectros de masa de cromatografía de gases de pirólisis de proantocianidina después de la repurificación de 95% de extracto de etanol de proantocianidina Boehmeria nivea L. Gaud.;

- 35 La figura 3 representa el espectro de absorción infrarroja de la proantocianidina después de la repurificación del extracto de etanol al de 95% de Boehmeria nivea L. Gaud.;

Las figuras 4a-4b representan espectros de masas de cromatografía líquida de alta resolución (+/-) de proantocianidina después de la repurificación de 95% de extracto de etanol de Boehmeria nivea L. Gaud.;

Las figuras 5a-5c representan espectros  $^{13}\text{C}$  RMN y  $^1\text{H}$  RMN de proantocianidina después de la repurificación de 95% de extracto de etanol de *Boehmeria nivea* L. Gaud.;

5 Las figuras 6a-6b muestran respectivamente enlace C4-C8 y enlace C4-C6, de acuerdo con espectros de detección de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN, en la divulgación, las unidades monoméricas de polímero de proantocianidina purificado se unen entre sí principalmente a través de enlaces C4-C8;

Las figuras 7a-7c representan espectros de masas de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF) de proantocianidina después de la repurificación de extracto de etanol al de 95% de *Boehmeria nivea* L. Gaud.;

10 La figura 8 muestra el efecto de las composiciones farmacéuticas (BEL-X) sobre la tasa de supervivencia en ratones transgénicos con HCC inducido por el gen X del virus de la hepatitis B, en la divulgación;

La figura de 9 muestra el efecto de las composiciones farmacéuticas (BEL-X) en HCC en ratones transgénicos con HCC inducido por el gen X del virus de la hepatitis B, en la divulgación, estimada por la proporción peso/peso corporal del hígado;

15 La figura 10 muestra el efecto de las composiciones farmacéuticas (BEL-X) sobre la función hepática en ratones transgénicos con HCC inducido por el gen X del virus de la hepatitis B, en la divulgación, estimada por el índice de función hepática - ALT;

La figura 11 muestra el efecto de composiciones farmacéuticas (BEL-X) sobre la función hepática de ratones transgénicos con HCC inducido por el gen X del virus de la hepatitis B, en la divulgación, estimada por el índice de función hepática - AST;

20 La figura 12 muestra el efecto de las composiciones farmacéuticas (BEL-X) sobre la fibrosis hepática inducida por la sustancia química DEN en ratas, en la divulgación, estimada por el contenido de hidroxiprolina;

La figura. 13 muestra el efecto de las composiciones farmacéuticas (BEL-X) sobre la fibrosis hepática inducida por la sustancia química DEN en ratas, en la divulgación, estimada por el área de tinción con  $\alpha$ -SMA;

25 La figura. 14 muestra el efecto de las composiciones farmacéuticas (BEL-X) sobre la fibrosis hepática inducida por la sustancia química DEN en ratas, en la divulgación, estimada por contenido de hidroxiprolina;

Las figuras 15-16 muestran el efecto de las composiciones farmacéuticas (BEL-X) sobre la tasa de supervivencia de ratas con fibrosis hepática/cáncer de hígado inducido por la sustancia química DEN, en la divulgación; y

30 La figura. 17 muestra el efecto de las composiciones farmacéuticas (BEL-X) sobre la regeneración hepática de ratas con fibrosis hepática inducida por la sustancia química DEN, en la divulgación, estimado por la proporción de regeneración del volumen hepático.

Descripción detallada

35 En la siguiente descripción detallada, a los efectos de la explicación, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de las realizaciones descritas. Sin embargo, será evidente que una o más realizaciones pueden practicarse sin estos detalles específicos. En otros casos, se muestran esquemáticamente estructuras y dispositivos bien conocidos para simplificar el dibujo.

La divulgación adopta proantocianidina como ingrediente activo de la composición farmacéutica (BEL-X) para lograr el propósito de promover la regeneración de hígado dañado.

40 En la divulgación, la proantocianidina que tiene el efecto de promover la regeneración de hígado dañado se puede extraer de una planta. En una realización, la planta usada puede comprender una planta de Ericaceae, Rosaceae, Pinaceae, Vitaceae o Urticaceae, preferiblemente Urticaceae *Boehmeria nivea* L. Gaud. La parte extraída de la planta puede comprender raíces, tallos, hojas y/o frutos.

En la divulgación, la planta se puede extraer usando métodos generales conocidos. En una realización, se cortan o rallan raíces, tallos, hojas y/o frutos secos de una planta. A continuación, la planta se extrae usando una solución de extracción. En una realización, raíces y/o tallos de la *Boehmeria nivea* L. Gaud. se selecciona para extracto

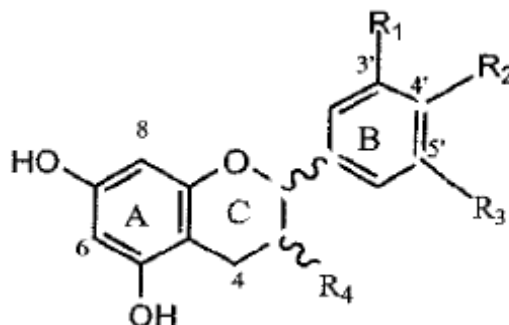
45 La solución de extracción se puede seleccionar entre agua o una solución mezclada con agua y solventes con diferentes polaridades del agua. Los solventes con diferentes polaridades de agua pueden comprender alcohol, acetona, metanol o acetato de etilo. Los solventes se pueden usar solos, mezclados entre sí o mezclados con agua. La proporción de la solución de extracción y la planta no tiene ninguna limitación particular. En una realización, la proporción de la solución de extracción y la planta es de 1:10 (p/p).

Durante la extracción, la temperatura de extracción puede cambiar ligeramente a medida que se seleccionan diferentes soluciones de extracción. En una realización, la planta se puede sumergir en una solución de extracción a temperatura ambiente. En otra realización, la solución de extracción se puede calentar a la temperatura de reflujo (60-100 °C) de la misma. El tiempo de extracción es de aproximadamente 2 horas a siete días, dependiendo de la temperatura de extracción. Además, durante la operación de extracción, por ejemplo, se puede añadir cloruro de sodio, ácido inorgánico diluido (por ejemplo, ácido clorhídrico diluido) o ácido orgánico (por ejemplo, vitamina C o ácido tartárico) a la solución de extracción según sea necesario para ajustar el valor del pH de la solución de extracción.

A continuación, el extracto que contiene el ingrediente activo de proantocianidina se concentra y se seca, o se puede realizar una purificación parcial o purificación completa en el extracto según sea necesario. En una realización, para el método de la purificación parcial, el extracto seco se vuelve a disolver en alcohol al de 95% y/o una solución acuosa de metanol. A continuación, la solución resultante se extrae usando solventes con diferentes polaridades para eliminar impurezas parciales, por ejemplo, usando un solvente apolar (por ejemplo, N-hexano) para eliminar lípidos y sustancias apolares, y luego usando triclorometano y/o acetato de etilo para eliminar pequeños compuestos de fenol. A continuación, la fase líquida extraída con solvente se concentra y se seca para obtener proantocianidina parcialmente purificada.

El método de purificación completo puede comprender las siguientes etapas. El extracto parcialmente purificado se disuelve en una solución acuosa de alcohol o metanol y se coloca en una columna de tamiz molecular. A continuación, se realiza una elución usando diferentes soluciones y/o soluciones de mezcla para purificar y separar la proantocianidina. En una realización, la secuencia de elución de diferentes soluciones es de 95% de alcohol, de 95% de alcohol/metanol (1:1, v/v), solución acuosa de 50% de metanol y 50% de acetona. Las soluciones que se eluyen a través de cada eluyente se recogen en lotes. A continuación, la proantocianidina purificada en la solución eluida se detecta usando cromatografía líquida (280 nm). Las soluciones de proantocianidina con diversas distribuciones de pesos moleculares se pueden obtener recogiendo las soluciones que se eluyen a través de diferentes eluyentes. A continuación, la solución eluida se concentra a 40 °C por debajo y se liofiliza para obtener la proantocianidina purificada. En una realización, la columna de tamiz molecular usada en la elución es la columna Sephadex LH-20 (adquirida de German Amersham Corporation).

En la divulgación, las unidades monoméricas de la proantocianidina purificada tienen la siguiente fórmula.



En una realización, cuando R<sub>1</sub> es OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> es OH y R<sub>3</sub> es H. En otra realización, cuando R<sub>1</sub> es OH, R<sub>2</sub> es H y R<sub>3</sub> es H. En otra realización, cuando R<sub>1</sub> es OH, R<sub>2</sub> es OH y R<sub>3</sub> es H. En otra realización, cuando R<sub>1</sub> es OH, R<sub>2</sub> es OH y R<sub>3</sub> es OH. En la fórmula, R<sub>4</sub> puede ser 3-(α)-OH, 3-(β)-OH, 3-(α)-O-azúcar o 3-(β)-O-azúcar.

Las unidades monoméricas de la proantocianidina pueden comprender isómeros ópticos R o S en C2, C3 o C4.

La estructura de las unidades monoméricas de la proantocianidina puede comprender compuestos flavonoides, por ejemplo, catequina, epicatequina, epiafzetequina, galocatequina, galloepicatequina, epigallocatequina, flavanoides, leucocianidinas o procinidinas. En una realización, las unidades monoméricas de la proantocianidina pueden comprender derivados de flavan-3-ol o flavano.

En la divulgación, la proantocianidina tiene un grado de polimerización que varía desde 2 a 30, preferiblemente desde 3 a 20. Las unidades monoméricas de la proantocianidina se pueden unir entre sí mediante enlace C4-C8, enlace C4-C6, o enlace C2-O7. La proantocianidina tiene un peso molecular promedio que varía desde 600 a 10,000.

En una realización, la proantocianidina purificada puede comprender proantocianidina con un único grado de polimerización. En otra realización, la proantocianidina purificada puede comprender una mezcla de proantocianidina con diversos grados de polimerización.

En la divulgación, la proantocianidina extraída se puede preparar en una composición farmacéutica para promover la regeneración de hígado dañado, que puede comprender la proantocianidina y un portador o sal farmacéuticamente aceptable.

- 5 El portador farmacéuticamente aceptable puede comprender, pero no está limitado a, un solvente, medio de dispersión, recubrimiento, agente antibacteriano, agente antifúngico, agente de retardo de la absorción isotónica o compatibilizador farmacéutico. Para diferentes modos de administración, la composición farmacéutica se puede preparar en diversas formas de dosificación apropiadas usando métodos conocidos.

- 10 La sal farmacéuticamente aceptable puede comprender, pero no se limita a, sales inorgánicas o sales orgánicas. Las sales inorgánicas pueden comprender, por ejemplo, sales de metales alcalinos tales como sales de sodio, sales de potasio o sales de amina, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de magnesio o sales de calcio, o sales de catión divalentes o tetravalentes tales como sales de zinc, sales de aluminio o sales de circonio. Las sales orgánicas pueden comprender sales de diclohexilamina, sales de metil-d-glucamina o sales de aminoácidos tales como sales de arginina, sales de lisina, sales de histidina o sales de glutamina.

- 15 Los modos de administración de la composición farmacéutica (BEL-X) pueden comprender administración por vía oral, no oral, aerosol por inhalación o a través de un depósito implantado. Los modos no orales pueden comprender técnicas de inyección o perfusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasnovial, intraesternal, intratecal o intralesional.

Las formas de dosificación oral pueden comprender, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, emulsiones, suspensiones acuosas, dispersiones o soluciones.

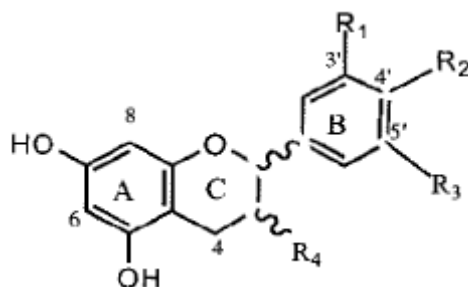
- 20 La composición farmacéutica (BEL-X) se encuentra después de pruebas experimentales que se pueden aplicar al tratamiento de diversas enfermedades hepáticas, que incluyen (1) cáncer de hígado causado por infección del virus de la hepatitis B crónica o virus de la hepatitis C. La composición farmacéutica (BEL-X) se puede usar solo o usar como agentes adyuvantes para otros diversos métodos de tratamiento, que pueden mejorar las funciones hepáticas de los pacientes con HCC, reducir la progresión del cáncer de hígado, aumentar la tasa operable y la tasa de éxito de la cirugía de pacientes con HCC, reducir la tasa de recurrencia postoperatoria, aumentar la tasa de supervivencia y prolongar el tiempo de supervivencia de los pacientes con HCC, así como mejorar la calidad de vida de los pacientes con HCC. (2) La composición farmacéutica (BEL-X) se puede usar sola o usar en combinación con otros fármacos clínicos para el tratamiento de la fibrosis hepática. (3) La composición farmacéutica (BEL-X) se puede usar sola o usar en combinación con otros fármacos clínicos para tratar pacientes con hígado graso y mejorar las funciones hepáticas para prevenir la cirrosis hepática y el cáncer de hígado.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Determinación de la estructura de las unidades monoméricas del polímero de proantocianidina

- 35 La estructura unitaria monomérica de la proantocianidina se detectó por cromatografía de gases de pirólisis-espectrometría de masas (PGC/MS). El método de detección colocó directamente proantocianidina purificada sólida (una muestra purificada por el inventor) en cromatografía de gases de pirólisis y se calentó gradualmente o se calentó instantáneamente con una temperatura segmentada (50 °C a 500 °C) o modo de operación de temperatura única. La muestra descompuesta térmicamente se separó a través de una columna metálica específica de la cromatografía de gases de pirólisis. La estructura de la unidad monomérica del polímero de proantocianidina se determinó mediante los espectros producidos a partir del detector de la espectrometría de masas. El espectro de masas y el análisis de estructura del polímero de proantocianidina se muestran en las figuras 2a y 2b, respectivamente, en la que las partes izquierdas de las figuras 2b-2e son los valores m/z y las estructuras químicas representadas por los picos en la figura 2a, y las partes correctas de la misma son el análisis de la unidad monomérica de los picos en las partes izquierdas. La fórmula de la estructura de unidad de monómero determinada del polímero de proantocianidina se representa de la siguiente manera:



En donde, R<sub>1</sub> es OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> es OH y R<sub>3</sub> es H, o R<sub>1</sub> es OH y R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son H, o R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son OH y R<sub>3</sub> es H, o R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son OH.

Los espectros de masas medidas térmicamente descompuestas muestran los picos de las señales de glucósido. Por lo tanto, se supuso que R<sub>4</sub> puede ser 3-(α)-OH, 3-(β)-OH, 3-(α)-O-azúcar o 3-(β)-O-azúcar.

## 5 Análisis del espectro de absorción infrarroja

La muestra de proantocianidina purificada y el cloruro de potasio se mezclaron, comprimieron y detectaron mediante luz infrarroja de transmisión. El resultado se muestra en la figura. 3, en la que los fuertes picos de absorción fueron 3412.38 nm, 1610.57 nm, 1521.40 nm, 1441.14 nm, 1284.86 y 1100.88 nm.

Análisis espectral de cromatografía líquida de alto rendimiento y espectrometría de masas

- 10 La muestra de proantocianidina purificada se detectó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución-espectrometría de masas (espectrometría de masas por electroaspersión (+/-), HPLC/ESI+, HPLC/ESI-)(Micromass Quattro/Waters 2690). Se detectaron las unidades monoméricas y los polímeros de la proantocianidina con un grado de polimerización que varía desde 1 a 6 y 164-glucósido (por ejemplo, los pesos moleculares de las unidades monoméricas y el peso molecular de 164 de un glucósido). Los espectros de masas (+/-) de la cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas de la proantocianidina purificada se muestran en las figuras 4a y 4b.

Análisis espectral de <sup>13</sup>C RMN y <sup>1</sup>H RMN

- 20 La muestra purificada de proantocianidina se detectó mediante <sup>13</sup>C RMN y <sup>1</sup>H RMN. Los resultados de detección de <sup>13</sup>C RMN se muestran en las figuras 5a-5c, en la que, a 142-145.7 ppm, además de los picos del doblete-doblete, no se muestran otros picos. El resultado indicó que las unidades monoméricas comprenden antocianidina sin delfindina (por ejemplo, con tres grupos -OH en el anillo B de los mismos). Los resultados del análisis son los mismos que los de EGA/MS. En la figura 5b, R<sub>1</sub> = H u OH, R<sub>2</sub> = H u OH u OCH<sub>3</sub>.

De acuerdo con los espectros de detección de <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN, en la divulgación, las unidades monoméricas del polímero de proantocianidina purificado se unen entre sí principalmente mediante enlaces C4-C8. El enlace C4-C8 y el enlace C4-C6 se muestran en las figuras 6a y 6b, respectivamente.

- 25 Análisis de espectro de espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF)

- 30 La distribución del peso molecular de la proantocianidina parcialmente purificada se detectó mediante una espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF). Los resultados se muestran en las figuras 7a-7c. Los resultados de la detección indicaron que la distribución del peso molecular de la proantocianidina parcialmente purificada era desde 500 a 5,000. Se supuso que el polímero tenía un grado de polimerización que varía desde 2 a 18 según los resultados de detección de la distribución del peso molecular.

## Ejemplo 2

Preparación del extracto que contiene proantocianidina (1)

- 35 Raíces y tallos que conectan las raíces del material medicinal Boehmeria nivea L. Gaud., se lavaron con agua y se secaron en un ambiente natural. El material medicinal seco se cortó en cortes con un espesor de aproximadamente 5 mm y se almacenó a 4 °C. El material medicinal Boehmeria nivea L. Gaud. almacenado fue molido por un muller y se pasó a través de un tamiz de 20 mallas. El polvo obtenido se dispersó en etanol al de 95% (10 veces en peso) (1:10, p/p) y se sometió a reflujo térmico durante 2 horas (dos veces). Después de enfriar a temperatura ambiente, se recogió la solución de extracción. La solución de extracción se centrifugó y se filtró mediante una centrífuga. El filtrado se concentró a continuación mediante un concentrador de presión reducida a una temperatura inferior a 40 °C y se secó mediante un liofilizador para obtener un extracto que contiene proantocianidina.

## Ejemplo 3

Preparación del extracto que contiene proantocianidina (2)

- 45 El material medicinal seco almacenado a 4 °C del ejemplo 2 fue molido por un muller y se pasó a través de un tamiz de 20 mallas. El polvo obtenido se dispersó en agua de ósmosis inversa (10 veces en peso) (1:10, p/p) y se sometió a reflujo térmico durante 2 horas (dos veces). Después de enfriar a temperatura ambiente, se recogió la solución de extracción. Se añadió etanol al 50%-95% a la solución de extracción y se enfrió para provocar la precipitación. El sobrenadante se centrifugó y se filtró mediante una centrífuga. El filtrado se concentró a continuación mediante un

concentrador de presión reducida a una temperatura inferior a 40 °C y se secó mediante un liofilizador para obtener un extracto que contenía proantocianidina.

#### Ejemplo 4

Purificación del extracto que contiene proantocianidina (1)

- 5 El extracto que contiene proantocianidina del ejemplo 2 o 3 se añadió a n-hexano (1:10, p/v) y se sometió a reflujo térmico (mediante un aparato Soxhelt) durante 6 horas para eliminar el lípido en el extracto. El sólido obtenido se disolvió en una solución acuosa de metanol al 70% y/o solución acuosa de vitamina C al 0.3% y se concentró mediante un concentrador de presión reducida a una temperatura inferior a 40 °C para eliminar el solvente. A continuación, los concentrados se añadieron a triclorometano (triclorometano: concentrados = 1:1, v/v) y oscilaron durante 30 minutos con un oscilador (multiextracción). Se añadió acetato de etilo a la fase líquida (acetato de etilo:fase líquida -1:1, v/v) y se hizo oscilar durante 30 minutos (multiextracción). La fase líquida se concentró a continuación mediante un concentrador de presión reducida a una temperatura inferior a 40 °C y se secó mediante un liofilizador para obtener proantocianidina parcialmente purificada.

#### Ejemplo 5

- 15 Purificación del extracto que contiene proantocianidina (2)

El extracto que contiene proantocianidina del ejemplo 2 o 3 se disolvió en agua/etanol (1:10, p/v). A continuación, se añadió n-hexano (1:10, v/v) y se hizo oscilar durante 30 minutos con un oscilador (multiextracción) para eliminar los lípidos en el extracto. Se añadió acetato de etilo a la fase líquida (acetato de etilo:fase líquida = 1:1, v/v) y se hizo oscilar durante 30 minutos (multiextracción). La fase líquida se añadió a n-butanol (1:10, v/v) y se hizo oscilar durante 30 minutos con un oscilador (multiextracción). La fase líquida se concentró entonces mediante un concentrador de presión reducida a una temperatura inferior a 40 °C y se secó mediante un liofilizador para obtener proantocianidina parcialmente purificada.

#### Ejemplo 6

Purificación del extracto que contiene proantocianidina (3)

- 25 La proantocianidina parcialmente purificada obtenida del ejemplo 4 se repurificó mediante cromatografía en columna de tamiz molecular (columna de cromatografía de permeación en gel, Sephadex LH-20, 4 cm de diámetro x 45 cm de longitud). Primero, se realizó una elución usando soluciones con diferentes polaridades para eliminar las impurezas. A continuación, se disolvieron 2.5 g de proantocianidina parcialmente purificada en 0.5 ml de etanol al de 95%. La muestra disuelta se colocó luego en una columna de tamiz molecular y se eluyó de forma continua mediante una serie de solventes (eluyentes). Se recogieron los eluatos eluidos a través de diversos solventes (eluyentes). Los eluyentes fueron 300 ml de etanol al de 95%, 300 ml de etanol al de 95%/metanol (1/1, v/v), 300 ml de metanol. 300 ml de una solución acuosa de metanol al 50% y 300 ml de una solución acuosa de acetona al 50%, secuencialmente. Excepto por el eluato eluido a través del eluyente de 300 ml de etanol al de 95%, otros eluatos eluidos se concentraron a continuación mediante un concentrador de presión reducida a una temperatura inferior a 40 °C y se secaron con un liofilizador para obtener proantocianidina parcialmente purificada o completamente purificada. La sustancia seca se almacenó entonces a -20 °C. Solamente los ejemplos correspondientes a las presentes reivindicaciones, esto es, a la promoción de la regeneración de hígado dañado (ejemplos 14,15) son parte de la invención.

#### Ejemplo 7

- 40 Efecto de los fármacos (BEL-X) en la tasa de supervivencia de los ratones transgénicos X del virus de la hepatitis B inducidos por el cáncer de hígado

Animales experimentales: La procedencia parental de los animales usados en el experimento fue ratones machos transgénicos del gen X del virus de la hepatitis B (C57BL/6J-HBx (línea A0112)) publicados por BBRC<sup>1</sup> 2006.

- 45 Agrupación experimental y diseño experimental: los ratones se dividieron en 6 grupos, incluido un grupo de control de ratones no transgénicos (simulado sin Tg de 9-20M), un grupo control de fármaco de ratones no transgénicos (tratados con BEL -X sin Tg de 9-20M), un grupo de control de ratones transgénicos (simulado Tg de 9-20M), y tres grupos de prueba de fármaco de ratones transgénicos (tratados con BEL-X Tg): administración de un fármaco oral BEL-X (la composición farmacéutica de la divulgación) a los ratones una vez al día, respectivamente, desde la edad de 9 meses a 20 meses (tratados con BEL-X Tg de 9-20M), desde la edad de 12 meses a 20 meses (tratados con BEL-X Tg de 12-20M ) y desde la edad de 15 meses a 20 meses (tratados con BEL-X Tg de 15-20M). En el grupo control de los ratones no transgénicos (simulado sin Tg de 9-20M) y el grupo control de los ratones transgénicos (simulado Tg de 9-20M), se les dio agua potable a los ratones una vez al día desde la edad de 9 meses a 20 meses. En el grupo de control de fármacos de los ratones no transgénicos (tratados con BEL-X sin Tg de 9-20 M), se

administró un fármaco oral BEL-X a los ratones una vez al día desde la edad de 9 meses hasta los 20 meses. La dosificación del fármaco BEL-X fue de 1,000 mg/kg/día.

Conclusión:

- 5 1. Con referencia a la figura 8, 100% de los ratones machos transgénicos del gen X del virus de la hepatitis B produjeron cáncer de hígado a la edad de 20 meses, y la tasa de supervivencia de los mismos fue aproximadamente 64% (simulado Tg de 9-20M). La tasa de supervivencia de los ratones alimentados con el fármaco BEL-X a diversas edades fue, respectivamente, del 70% (la edad de 9-20 meses, tratados con BEL-X Tg de 9-20 M), 100% (la edad de 12-20 meses, tratados con BEL-X Tg de 12-20M) y 58% (la edad de 15-20 meses, tratados con BEL-X Tg de 15-20M).
- 10 2. Mediante el análisis estadístico Chi-Cuadrado, la tasa de supervivencia de los ratones machos transgénicos del gen X del virus de la hepatitis B alimentados con el fármaco BEL-X a la edad de 12-20 meses fue del 100% a la edad de 20 meses, significativamente.
3. Alimentar a los ratones machos transgénicos del gen X del virus de la hepatitis B con el BEL-X en una etapa temprana puede mejorar la tasa de supervivencia.

## 15 Ejemplo 8

Efecto de los fármacos (BEL-X) sobre el retraso del HCC en ratones transgénicos del gen X del virus de la hepatitis B

Animales experimentales: La procedencia parental de los animales usados en el experimento fue de ratones machos transgénicos del gen X del virus de la hepatitis B (C57BL/6J-HBx (línea A0112)) publicada por BBRC<sup>1</sup> 2006.

- 20 Agrupación experimental y diseño experimental: los ratones se dividieron en 6 grupos, incluido un grupo de control de ratones no transgénicos (simulado sin Tg de 9-20M), un grupo control de fármaco de ratones no transgénicos (tratados con BEL -X sin Tg de 9-20M), un grupo de control de ratones transgénicos (simulado Tg de 9-20M), y tres grupos experimentales de fármaco de ratones transgénicos (tratados con BEL-X Tg): administración de un fármaco oral BEL-X (la composición farmacéutica de la divulgación) a los ratones una vez al día, respectivamente, desde la
- 25 edad de 9 meses a 20 meses (tratados con BEL-X Tg de 9-20M), desde la edad de 12 meses a 20 meses (tratados con BEL-X Tg de 12-20M) y desde la edad de 15 meses a 20 meses (tratados con BEL-X Tg de 15-20M). En el grupo control de los ratones no transgénicos (simulado sin Tg de 9-20M) y el grupo control de los ratones transgénicos (simulado Tg de 9-20M), se les dio agua potable a los ratones una vez al día desde la edad de 9 meses a 20 meses. En el grupo de control de fármacos de los ratones no transgénicos (tratados con BEL-X sin Tg de 9-20
- 30 M), se administró un fármaco oral BEL-X a los ratones una vez al día desde la edad de 9 meses a 20 meses. La dosificación del fármaco BEL-X fue de 1,000 mg/kg/día.

Determinación de la proporción de peso del hígado y peso corporal: Los animales se sacrificaron y se diseccionaron para el muestreo del hígado (que contiene tumores hepáticos). El peso del hígado a escala se dividió por el peso corporal de los ratones para obtener la proporción entre el peso del hígado y el peso corporal.

35 Conclusión:

1. Con referencia a la figura de 9, la proporción del peso del hígado y el peso corporal de los ratones normales no transgénicos (simulado sin Tg) fue aproximadamente del 5%. La proporción del peso del hígado y el peso corporal de los ratones machos transgénicos del gen X del virus de la hepatitis B (simulado de Tg) aumentó a aproximadamente el 13% debido a la producción de cáncer de hígado a la edad de 20 meses. Por análisis estadístico ANOVA, la variación de la proporción del peso del hígado y el peso corporal de los ratones transgénicos y los ratones normales no transgénicos fue significativa.
- 40 2. Después de alimentar a los ratones normales no transgénicos con el BEL-X durante un año (la edad de 9-20 meses, tratados con BEL-X sin Tg de 9-20 M), la proporción del peso del hígado y el peso corporal fue del 5% lo mismo que la de los grupos sin consumo del fármaco. El resultado indicó que no hubo ningún efecto del fármaco en
- 45 animales normales.
3. Alimentar a los ratones machos transgénicos del gen X del virus de la hepatitis B con el fármaco BEL-X a diversas edades resultó en que la proporción del peso del hígado y el peso corporal se redujo a aproximadamente 8% en los tres grupos. La variación de la proporción del peso del hígado y el peso corporal de los grupos de consumo del fármaco de los ratones con la edad de 9-20 meses (tratados con BEL-X Tg de 9-20 M) y los ratones con la edad de
- 50 12-20 meses (tratados con BEL-X Tg 12-20M) y el grupo sin consumo del fármaco (simulado Tg de 9-20M) fue estadísticamente significativo.

## Ejemplo 9

Efecto de los fármacos (BEL-X) sobre las funciones hepáticas en ratones transgénicos con HCC inducido por el gen X del virus de la hepatitis B (1)

Animales experimentales: La procedencia parental de los animales usados en el experimento fue ratones transgénicos del gen X del virus de la hepatitis B macho X (C57BL/6J-HBx (línea A0112)) publicado por BBRC<sup>1</sup> 2006.

Agrupación experimental y diseño experimental: los ratones se dividieron en 6 grupos, incluido un grupo de control de ratones no transgénicos (simulado sin Tg de 9-18M), un grupo control de fármaco de ratones no transgénicos (tratados con BEL-X sin Tg de 9-18M), un grupo de control de ratones transgénicos (simulado Tg de 9-18M), y tres grupos experimentales de fármaco de ratones transgénicos (tratados con BEL-X Tg): administración de un fármaco oral BEL-X (la composición farmacéutica de la divulgación) a los ratones una vez al día, respectivamente, desde la edad de 9 meses a 18 meses (tratados con BEL-X Tg de 9-18 M), desde la edad de 12 meses a 18 meses (tratados con BEL-X Tg de 12-18M) y desde la edad de 15 meses a 18 meses (tratados con BEL-X Tg de 15-18M). En el grupo control de los ratones no transgénicos (simulado sin Tg de 9-18M) y el grupo control de los ratones transgénicos (simulado Tg de 9-18M), se les dio agua potable a los ratones una vez al día desde la edad de 9 meses a 18 meses. En el grupo de control de fármacos de los ratones no transgénicos (tratados con BEL-X sin Tg de 9-18M), se administró un fármaco oral BEL-X a los ratones una vez al día desde la edad de 9 meses a 18 meses. La dosificación del fármaco BEL-X fue de 1,000 mg/kg/día.

Detección de la función hepática - ICG: los ratones se les inyectó intravenosamente indocianina verde (ICG). Después de 10 minutos, se detectó la concentración (mg/dl) de ICG restante en la sangre, como un índice de la función hepática. Este experimento se llevó a cabo 2 veces, respectivamente, a la edad de 12 meses y 18 meses de los ratones.

Conclusión:

1. Con referencia a la siguiente tabla 1, el valor metabólico de ICG de los ratones normales no transgénicos a la edad de 18 meses (simulado sin Tg de 9-18M) fue  $2.25 \pm 0.89$  mg/dl. No hubo diferencias significativas entre este resultado y el del grupo alimentado con el BEL-X a la edad de 18 meses (tratados con BEL-X sin Tg de 9-18M).

2. El metabolismo de ICG de los ratones machos transgénicos del gen X del virus de la hepatitis B X (simulado Tg de 9-18M) se ralentizó y el valor aumentó a  $4.46 \pm 1.17$  mg/dl debido a la producción de cáncer de hígado a la edad de 18 meses. Mediante análisis estadístico no paramétrico, la diferencia del metabolismo de ICG de los ratones transgénicos y los ratones normales no transgénicos fue significativa.

3. Alimentar a los ratones machos transgénicos del gen X del virus de la hepatitis B con el fármaco BEL-X a diversas edades en los tres grupos resultó en que los valores metabólicos de ICG de los tres grupos fueron inferiores a los del grupo sin consumo del fármaco (simulado Tg de 9-18M). La diferencia del valor metabólico ICG del grupo alimentado con el fármaco BEL-X desde la edad de 9 meses (tratados con BEL-X Tg de 9-18 M) y el del grupo sin consumo del fármaco (simulado Tg de 9-18 M) fue estadísticamente significativo. El resultado indicó que el BEL-X puede mejorar las funciones hepáticas de los animales con HCC.

Tabla 1

| Grupos                             | Concentración de ICG (mg/dl) en sangre a la edad de 18 meses |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Simulado sin Tg de 9-18M           | $2.25 \pm 0.89$                                              |
| Tratados con BEL-X sin Tg de 9-18M | $2.13 \pm 0.92$                                              |
| Simulado Tg de 9-18M               | $4.46 \pm 1.17$                                              |
| Tratados con BEL-X Tg de 9-18M     | $2.63 \pm 0.76$                                              |
| Tratados con BEL-X Tg de 12-18M    | $3.47 \pm 0.77$                                              |
| Tratados con BEL-X Tg de 15-18M    | $3.87 \pm 0.72$                                              |

#### Ejemplo 10

Efecto de los fármacos (BEL-X) sobre las funciones hepáticas en ratones transgénicos con HCC inducido por el gen X del virus de la hepatitis B (2)

Animales experimentales: La procedencia parental de los animales usados en el experimento fue ratones machos transgénicos del gen X del virus de la hepatitis B (C57BLI6J-HBx (línea A0112)) publicado por BBRC1 2006.

Agrupación experimental y diseño experimental: los ratones se dividieron en 6 grupos, incluido un grupo de control de ratones no transgénicos (simulado sin Tg de 9-20M), un grupo control de fármaco de ratones no transgénicos (tratados con BEL-X sin Tg de 9-20M), un grupo de control de ratones transgénicos (simulado Tg de 9-20M), y tres grupos experimentales de fármaco de ratones transgénicos (tratados con BEL-X Tg): administración de un fármaco oral BEL-X (la composición farmacéutica de la divulgación) a los ratones una vez al día, respectivamente, desde la edad de 9 meses a 20 meses (tratados con BEL-X Tg de 9-20M), desde la edad de 12 meses a 20 meses (tratados con BEL-X Tg de 12-20M) y desde la edad de 15 meses a 20 meses (tratados con BEL-X Tg de 15-20M). En el grupo control de los ratones no transgénicos (simulado sin Tg de 9-20M) y el grupo control de los ratones transgénicos (simulado Tg de 9-20M), se les dio agua potable a los ratones una vez al día desde la edad de 9 meses a 20 meses. En el grupo de control de fármacos de los ratones no transgénicos (tratados con BEL-X sin Tg de 9-20 M), se administró un fármaco oral BEL-X a los ratones una vez al día desde la edad de 9 meses hasta los 20 meses. La dosificación del fármaco BEL-X fue de 1,000 mg/kg/día.

Detección de las funciones hepáticas: alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST): todos los ratones fueron sangrados (de la mandíbula o del corazón) una vez al mes. Se mantuvo sangre completa en el eppendorf a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. Después de la coagulación, la muestra de sangre se centrifugó con 1,800xg durante 10 minutos. Después de la centrifugación, el suero se extrajo en un nuevo eppendorf y se almacenó a -20 °C hasta el día de la prueba. Los valores de ALT y AST del suero se determinaron mediante un analizador bioquímico de suero húmedo (HITACHI 7080). Desde la edad de 9 meses, los índices de función hepática medidos (ALT y AST) de los ratones a la edad de 9-20 meses de cada grupo se analizaron exhaustivamente cada 3 meses debido a la correlación entre las lesiones hepáticas y la edad de los ratones machos transgénicos del gen X del virus de la hepatitis B.

Conclusión:

1. Con referencia a las figuras 10 y 11, la diferencia de ALT y AST de los ratones normales no transgénicos (simulado sin Tg de 9-20M) y los ratones transgénicos del gen X del virus de la hepatitis B (simulado Tg de 9-20M) se produjo a partir de la edad de 12 meses. No hubo una diferencia significativa de los índices de función hepática entre el grupo de ratones normales no transgénicos alimentados con BEL-X (tratados con BEL-X sin Tg de 9-20M) y el grupo sin consumo del fármaco (simulado sin Tg de 9-20M).

2. Alimentar a los ratones transgénicos del gen X del virus de la hepatitis B con el fármaco BEL-X a diversas edades resultó en que ALT y AST de los tres grupos eran más bajos que el del grupo sin consumo del fármaco (simulado Tg de 9-18M). La diferencia de ALT y AST de los grupos de consumo del fármaco de la edad de 9-20 meses (tratados con BEL-X Tg de 9-20 M) y la edad de 12-20 meses (tratados con BEL-X Tg de 12-20M) y el del grupo sin consumo de fármaco (simulado Tg de 9-20M) fue estadísticamente significativo. El resultado indicó que el BEL-X puede mejorar efectivamente las funciones hepáticas de los animales con HCC.

### Ejemplo 11

Efecto de los fármacos (BEL-X) sobre la fibrosis hepática inducida por la sustancia química DEN de las ratas (1)

Agrupación experimental y diseño experimental: ratas Wistar de 8 semanas fueron alimentadas con dietil nitrosamina (DEN) (100 ppm, añadida en agua) durante 6 semanas (grupo D6) y de 9 semanas (grupo D9) para inducir fibrosis hepática y cáncer de hígado. En los otros dos grupos, las ratas fueron alimentadas simultáneamente con DEN y el fármaco BEL-X (1000 mg/kg de peso corporal) (añadido en la alimentación y alimentado todos los días durante 6 semanas (grupo D6H6) y de 9 semanas (grupo D9H9)). El grado de cáncer de hígado de las ratas se analizó en diversos momentos. En los grupos de control, no se administró ningún fármaco durante todo el proceso. Cada grupo experimental tenía 10 ratas. Después de la sección patológica y la tinción, se interpretó el grado de fibrosis hepática/cáncer de hígado, lo que ayudó con el análisis bioquímico de hidroxiprolina. Se utilizó un aumento del contenido de hidroxiprolina en el hígado como índice de fibrosis hepática. Se recogieron hígados de ratas de cada grupo en diversos momentos para determinar el contenido de hidroxiprolina. A continuación, se seccionaron los hígados y se llevó a cabo el análisis de inmunotinción con  $\alpha$ -SMA. Un aumento del contenido de  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA) también se utilizó como otro índice de fibrosis hepática. En la 9ª semana, se recogieron hígados de ratas de cada grupo y se llevó a cabo inmunotinción con  $\alpha$ -SMA. Las células hepáticas se observaron usando un microscopio y se calculó la cantidad de células que contenían la etiqueta.

Conclusión:

1. Con referencia a la figura 12, en el grupo donde DEN fue alimentada continuamente durante 9 semanas (grupo D9), el contenido de hidroxiprolina en los hígados aumentó significativamente. El resultado indicó que DEN indujo la fibrosis hepática. Sin embargo, en el grupo experimental donde BEL-X (grupo D9H9) se alimentó continuamente, el

contenido de hidroxiprolina disminuyó significativamente. El resultado indicó que BEL-X previno el hígado de la fibrosis causada por la sustancia química DEN.

2. Con referencia a la figura 13, en el grupo en el que DEN se alimentó continuamente durante 9 semanas (grupo D9), el contenido de  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA) en los hígados aumentó significativamente. El resultado indicó que DEN indujo la fibrosis hepática. Sin embargo, en el grupo experimental donde BEL-X (grupo D9H9) se alimentó continuamente, el contenido de  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA) disminuyó significativamente. El resultado indicó que BEL-X previno el hígado de la fibrosis causada por la sustancia química DEN.

3. El contenido de  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA) también disminuyó significativamente en el grupo experimental donde DEN fue alimentado continuamente y BEL-X durante 6 semanas (grupo D6H6). El resultado indicó que BEL-X previno el hígado en etapa temprana de la fibrosis causada por la sustancia química DEN.

### Ejemplo 12

Efecto de los fármacos (BEL-X) sobre la fibrosis hepática inducida por la sustancia química DEN de las ratas (2)

Agrupación experimental y diseño experimental: ratas Wistar de 8 semanas se alimentaron con dietilnitrosamina (DEN) (100 ppm, añadida en agua) para inducir fibrosis hepática y cáncer de hígado. En otros tres grupos, las ratas fueron alimentadas simultáneamente con DEN y el fármaco BEL-X (1000 mg/kg de peso corporal). El BEL-X se alimentó en 3 grupos diferentes de la 3ª a la 6ª semana (DEN-BEL-X 3-6), de la 6ª a la 9ª semana (DEN-BEL-X 6-9) y de la 9ª a la 12ª semana (DEN-BEL-X de 9-12), respectivamente. El grado de cáncer de hígado de las ratas se analizó en puntos de tiempo adecuados. En el grupo de control (DEN), no se administró ningún fármaco durante todo el proceso de alimentación del DEN. Cada grupo experimental tenía 10 ratas. El grado de fibrosis hepática/cáncer de hígado se interpretó a través de un método visual, ayudando con el análisis bioquímico de hidroxiprolina. Se utilizó un aumento del contenido de hidroxiprolina en el hígado como índice de fibrosis hepática. Se recolectaron hígados de ratas de cada grupo en la semana 12ª para determinar el contenido de hidroxiprolina.

Conclusión:

1. Con referencia a la figura 14, en el grupo no tratado (DEN) donde DEN se alimentó continuamente durante 9 semanas, el contenido de hidroxiprolina en los hígados aumentó significativamente. El resultado indicó que DEN indujo fibrosis hepática. Por el contrario, el contenido de hidroxiprolina se redujo significativamente en las primeras etapas de la alimentación de los grupos BEL-X (DEN-BEL-X 3-6 y DEN-BEL-X 6-9). Los resultados demuestran que BEL-X revirtió la fibrosis hepática causada por la sustancia química DEN.

### Ejemplo 13

Efecto de los fármacos (BEL-X) en la tasa de supervivencia de las ratas con fibrosis hepática inducida por la sustancia química DEN

Agrupación experimental y diseño experimental: ratas Wistar de 8 semanas se alimentaron con dietilnitrosamina (DEN) (50 ppm, añadida en agua) durante 10.5 semanas para inducir fibrosis hepática y cáncer de hígado (grupo B). Las ratas fueron alimentadas simultáneamente con DEN y el fármaco BEL-X (1000 mg/kg de peso corporal) (añadido en la alimentación y alimentado todos los días, respectivamente, desde la 0 a la 10.5 semana (grupo C), desde la 3 a la 10.5 semana (Grupo D), y de la 6ª a la 10ª semana (grupo E). El BEL-X se alimentó durante 3 semanas después de dejar de alimentar al DEN (grupo F). El grado de cáncer de hígado de las ratas se analizó en los puntos de tiempo adecuados. En el grupo de control (grupo A), no se administró ningún fármaco durante todo el proceso. Las muertes de animales se registraron durante el experimento. La tasa de supervivencia de cada grupo se analizó mediante estadísticas no paramétricas.

Conclusión:

1. Con referencia a la figura 15, el análisis de la tasa de supervivencia de cada grupo en la 13.5 semana (día 94º) resultó en que, en el grupo B donde solo se alimentó DEN, la tasa de supervivencia fue solamente del 40%. Por el contrario, las tasas de supervivencia de la alimentación de BEL-X en diversos períodos fueron más del 80%. Los resultados indicaron que BEL-X mejoró la tasa de supervivencia de ratas con fibrosis hepática y cáncer de hígado con eficacia.

2. Con referencia a la figura 16, el análisis de la tasa de supervivencia de las ratas administradas con el fármaco BEL-X durante 3 semanas después de inducir cáncer de hígado por DEN (grupo F) en la 15ª semana (día 104º) dio como resultado que la tasa de supervivencia de las ratas fue del 100% el período (día 74º-94º) de administración de BEL-X. Además, no se encontró mortalidad durante los cinco días (día 95º-99º) después de suspender la administración del fármaco BEL-X. La tasa de supervivencia a la semana 15 (día 104º) fue del 62%, que es aún más alta que la tasa de supervivencia de 40% en la 13.5 semana (día 94º) del grupo B donde solo se alimentó DEN. Los

resultados indicaron que BEL-X puede prolongar el tiempo de supervivencia y mejorar la tasa de supervivencia de las ratas con cirrosis hepática y cáncer de hígado con eficacia.

#### Ejemplo 14

Efecto de los fármacos (BEL-X) sobre la regeneración del hígado dañado por DEN después de la hepatectomía (1)

- 5 Agrupación experimental y diseño experimental: ratas Wistar de 8 semanas se alimentaron con dietilnitrosamina (DEN) (100 ppm, añadida en agua) durante 9 semanas para inducir fibrosis hepática y cáncer de hígado (grupo sin consumo de fármacos). Las ratas tratadas se alimentaron simultáneamente con el fármaco BEL-X (dividido en grupo con dosis altas de BEL-X (1000 mg/kg de peso corporal) y grupo con dosis bajas de BEL-X (250 mg/kg de peso corporal)) de la 6ª a la 9ª semana. Después de que se completó la alimentación del fármaco, el 50% de los lóbulos hepáticos se resecaron en la 9ª semana. Después de dos días, la muestra de hígado se recogió y seccionó, y se llevó a cabo la tinción con H&E. A continuación, la mitosis de las células hepáticas se observó bajo un microscopio, como base para la regeneración hepática. La mitosis de las células hepáticas se calculó de la siguiente manera. Cada rata proporcionó al menos tres cortes de hígado. Cada corte comprendía 10 campos. Se contó el número de células mitóticas bajo un microscopio de aumento de 400X. Finalmente, se obtuvo el valor promedio del número de células mitóticas de ratas de cada grupo.

Conclusión:

1. Con referencia a la siguiente tabla 2, la realización de hepatectomía después de inducir fibrosis hepática y cáncer de hígado con la sustancia química DEN resultó en que el recuento de mitosis ( $7.6 \pm 4.6$ ) de los hígados de las ratas del grupo que no consumía fármaco fue mucho más bajo que el recuento de mitosis ( $12 \pm 5.5$  o  $13.0 \pm 5.6$ ) de los hígados de las ratas alimentadas simultáneamente con alta dosis o bajas dosis del fármaco BEL-X durante 3 semanas. Los resultados indicaron que, la regeneración hepática se puede mejorar en el hígado dañado por DEN químico con eficacia.

Tabla 2

| Grupos                              | Recuentos de mitosis |
|-------------------------------------|----------------------|
| Grupo de dosificación alta de BBL-X | $12.0 \pm 5.5$       |
| Grupo de dosificación baja de BBL-X | $13.0 \pm 5.6$       |
| Grupo sin consumo del fármaco       | $7.6 \pm 4.6$        |

#### Ejemplo 15

Efecto de los fármacos (BEL-X) en la regeneración del hígado dañado por DEN después de la hepatectomía (2)

- 30 Agrupación experimental y diseño experimental: ratas Wistar de 8 semanas se alimentaron con dietilnitrosamina (DEN) (100 ppm, añadida en agua) durante 9 semanas para inducir fibrosis hepática y cirrosis hepática (grupo DEN). Las ratas tratadas se alimentaron simultáneamente con el fármaco BEL-X (1000 mg/kg de peso corporal) desde la 6ª a la 9ª semana (grupo BEL-X). Tanto las ratas DEN como BEL-X sin administración fueron el grupo de control. Después de completarse la alimentación del fármaco, se realizó un examen por resonancia magnética y el 30% de los lóbulos hepáticos se resecaron en la 9ª semana. En el grupo control no alimentado con DEN y BEL-X, se realizó la misma cirugía. Después de dos semanas, se llevó a cabo el segundo examen de resonancia magnética y se sacrificaron las ratas. Las muertes de animales se registraron durante el experimento. Después de la cirugía, se observó el tiempo de alimentación y la cantidad de alimento de las ratas de cada grupo. Se calculó la tasa de supervivencia de las ratas de cada grupo.

Conclusión:

- 40 1. Con referencia a la figura 17, se interpretó la proporción de regeneración del volumen hepático. En el grupo de control, el volumen total de regeneración hepática de las ratas con un hígado normal fue del  $92 \pm 11\%$  del volumen de resección. En el grupo DEN (grupo de cirrosis hepática), el volumen total de regeneración hepática de las ratas fue  $32 \pm 7\%$  del volumen de resección. En el grupo BEL-X (grupo de tratamiento), el volumen total de regeneración hepática de las ratas fue del  $79 \pm 6\%$  del volumen de resección. El grado de regeneración hepática del grupo BEL-X (grupo de tratamiento) aumentó significativamente al del grupo DEN (grupo de cirrosis hepática). Por el contrario, no hay diferencia estadística con la del grupo de control.

- 5 2. Con referencia a la siguiente Tabla 3, después de realizar la hepatectomía en las ratas con cirrosis hepática, el tiempo de alimentación (27 horas) fue significativamente más prolongado que el tiempo de alimentación (11 horas) del grupo de control. Sin embargo, en el grupo BEL-X, el tiempo de alimentación (16 horas) después de la hepatectomía fue significativamente más corto que el del grupo DEN (grupo de cirrosis hepática). Además, el consumo de alimentos (42%) del grupo DEN (grupo de cirrosis hepática) fue menor que el del grupo control (91%). El consumo de alimentos (83%) del grupo BEL-X es significativamente más alto que el del grupo DEN (grupo de cirrosis hepática), y similar al del grupo control. Los resultados indicaron que el fármaco BEL-X tuvo un buen efecto sobre la cirrosis hepática de las ratas después de la cirugía de hepatectomía, lo que aumentó el consumo de alimentos y redujo el tiempo de alimentación.
- 10 3. Además, la tasa de supervivencia de las ratas con cirrosis hepática fue del 55%. Sin embargo, al alimentar a las ratas con cirrosis hepática con el BEL-X, la tasa de supervivencia fue la misma que la del grupo de control, alcanzando el 100%. De hecho, los resultados indicaron que el fármaco BEL-X aumentó la tasa de supervivencia.

Tabla 3

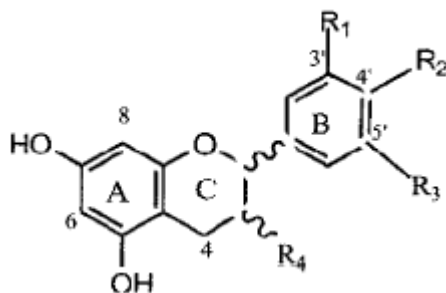
|                                                                  | Grupo de control | Grupo DEN  | Grupo BEL-X |
|------------------------------------------------------------------|------------------|------------|-------------|
| Cantidad de alimentación (%) al tercer día después de la cirugía | 91 ± 3           | 42 ± 5     | 83 ± 4      |
| Tiempo de comida (hora) después de la cirugía                    | 11.0 ± 1.2       | 27.0 ± 3.3 | 16.0 ± 2.4  |
| Tasa de supervivencia (%)                                        | 100              | 55         | 100         |

- 15 Será evidente para los expertos en el arte que se pueden realizar diversas modificaciones y variaciones a las realizaciones descritas. Se pretende que la especificación y los ejemplos se consideren solo a modo de ejemplo, con el verdadero alcance de la divulgación que se indica mediante las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso como medicamento para promover la regeneración de hígado dañado, en un paciente que comprende:

5 una proantocianidina con una cantidad eficaz, en la que las unidades monoméricas de la proantocianidina tienen la siguiente fórmula:



en la que, cuando R<sub>1</sub> es OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> es OH y R<sub>3</sub> es H, cuando R<sub>1</sub> es OH, R<sub>2</sub> es H y R<sub>3</sub> es H, cuando R<sub>1</sub> es OH, R<sub>2</sub> es OH y R<sub>3</sub> es H, o cuando R<sub>1</sub> es OH, R<sub>2</sub> es OH y R<sub>3</sub> es OH, y R<sub>4</sub> es 3-(α)-OH, 3-(β)-OH, 3-(α)-O-azúcar o 3-(β)-O-azúcar; y

10 un portador o sal farmacéuticamente aceptable.

2. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que las unidades monoméricas de la proantocianidina están unidas entre sí mediante enlaces C4-C8, enlaces C4-C6 o enlaces C2-O7.

3. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, en la que la proantocianidina tiene un grado de polimerización que varía de 2 a 30.

15 4. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, en la que las unidades monoméricas de la proantocianidina comprenden isómeros ópticos R o S en C2, C3 o C4.

5. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, en la que las unidades monoméricas de la proantocianidina comprenden compuestos flavonoides.

20 6. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, en la que los compuestos flavonoides comprenden catequina, epicatequina, epiafzelequina, galocatequina, galloepicatequina, epigallocatequina, flavonoles, flavandioles, leucocianidinas o procinidinas.

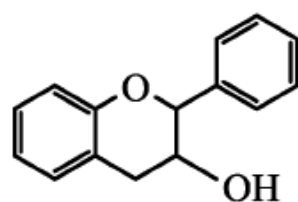
7. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, en la que las unidades monoméricas de la proantocianidina comprenden flavan-3-ol.

25 8. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, en la que la proantocianidina se extrae de una planta.

9. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 8, en la que la planta comprende una planta de Ericaceae, Rosaceae, Pinaceae, Vitaceae o Urticaceae.

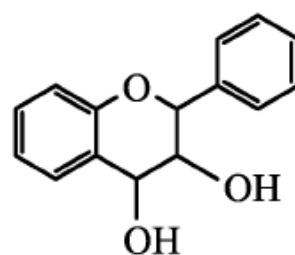
10. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación de 9, en la que la planta de Urticaceae comprende Boehmeria nivea L. Gaud.

30



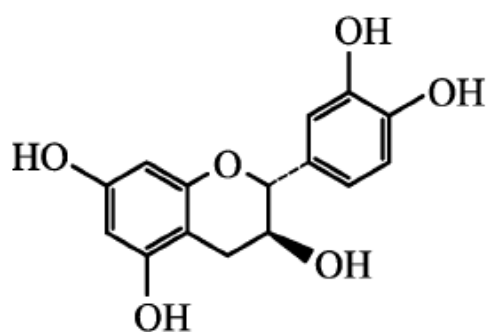
3-flavanol

FIG. 1A



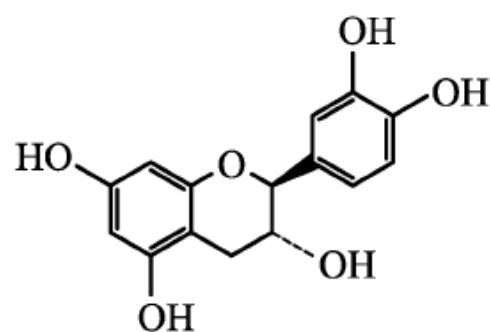
3,4-flavanol

FIG. 1B



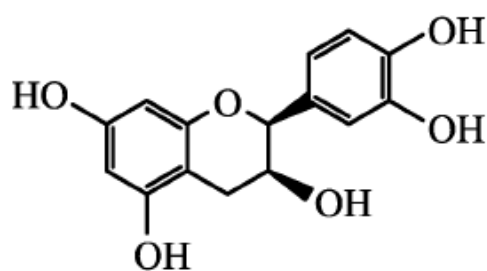
(+)-catequina (2R,3S)

FIG. 1C



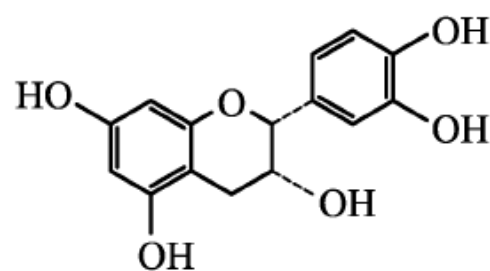
(-)-catequina (2R,3S)

FIG. 1D



(+)-epicatequina (2S,3S)

FIG. 1E



(-)-epicatequina (2R,3R)

FIG. 1F

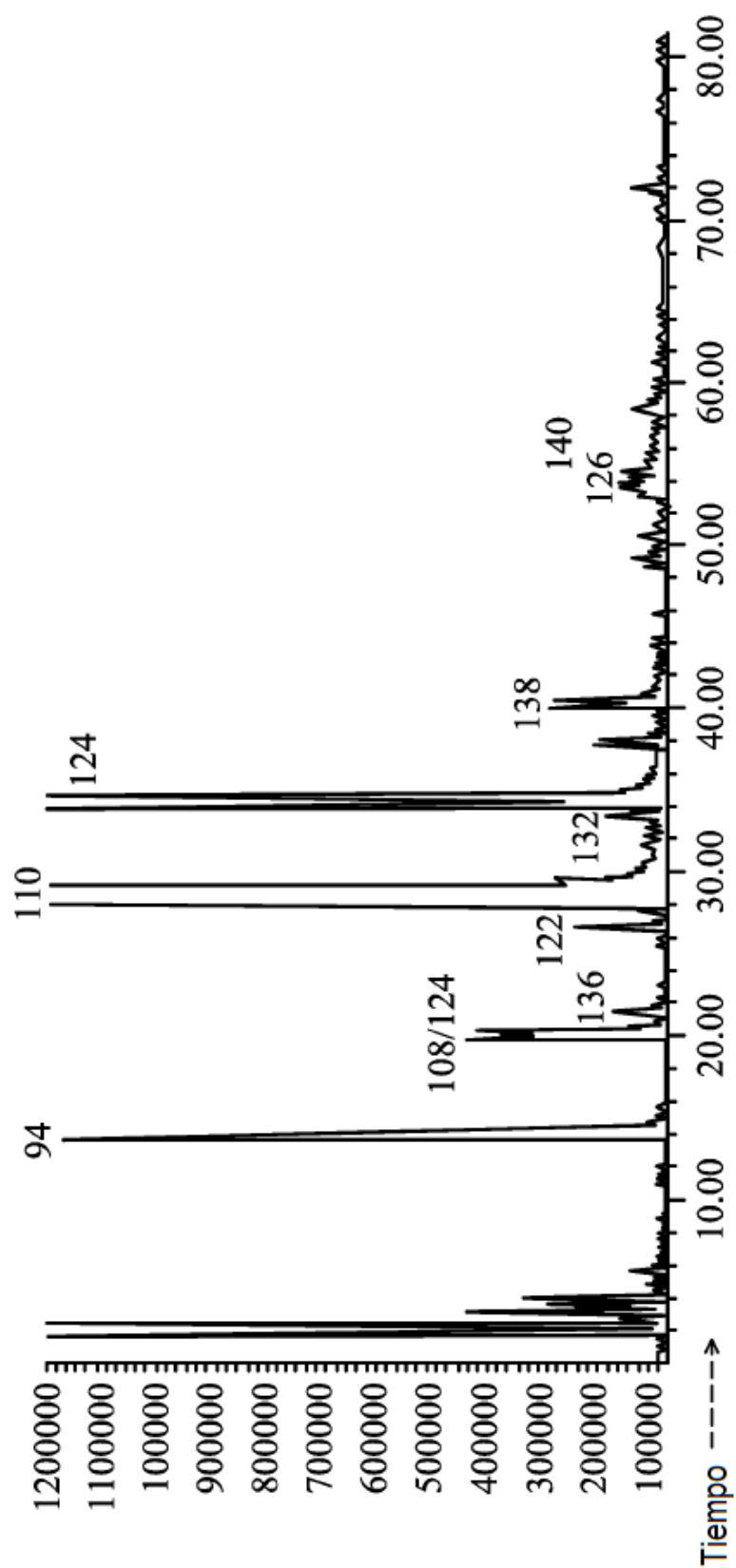
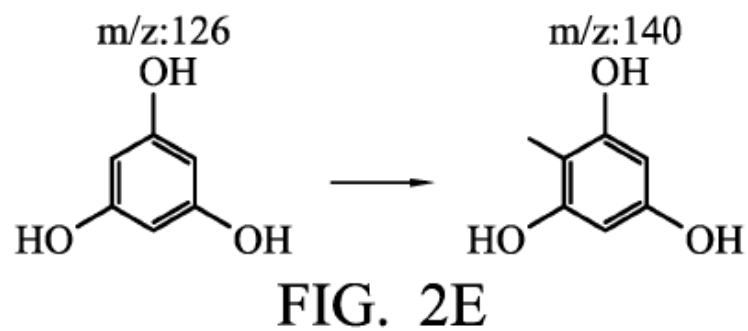
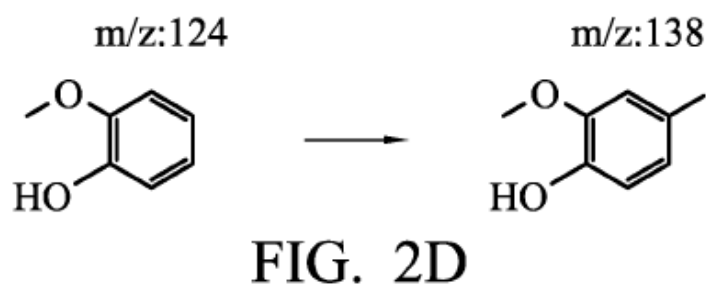
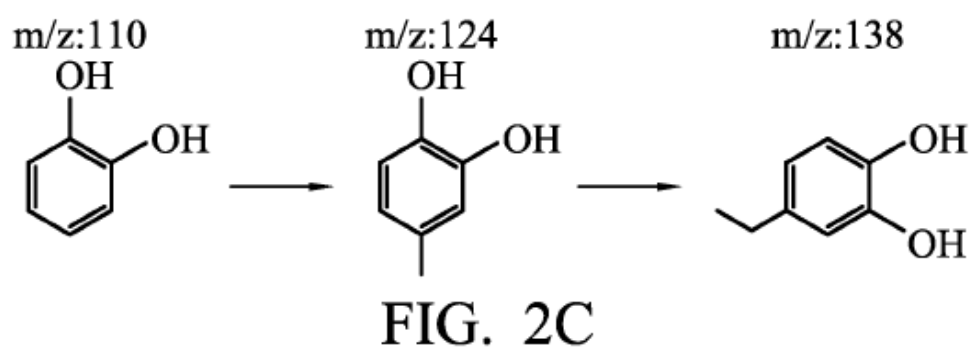
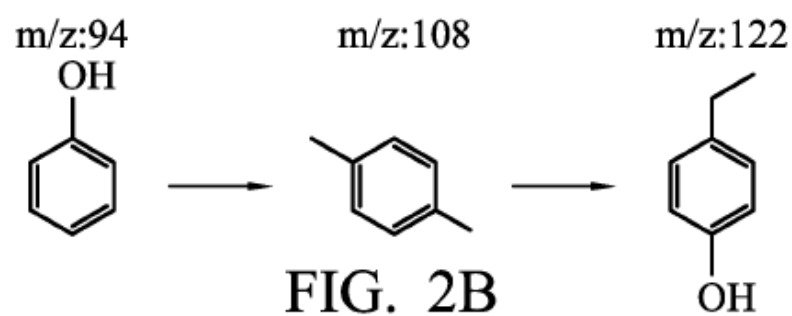


FIG. 2A



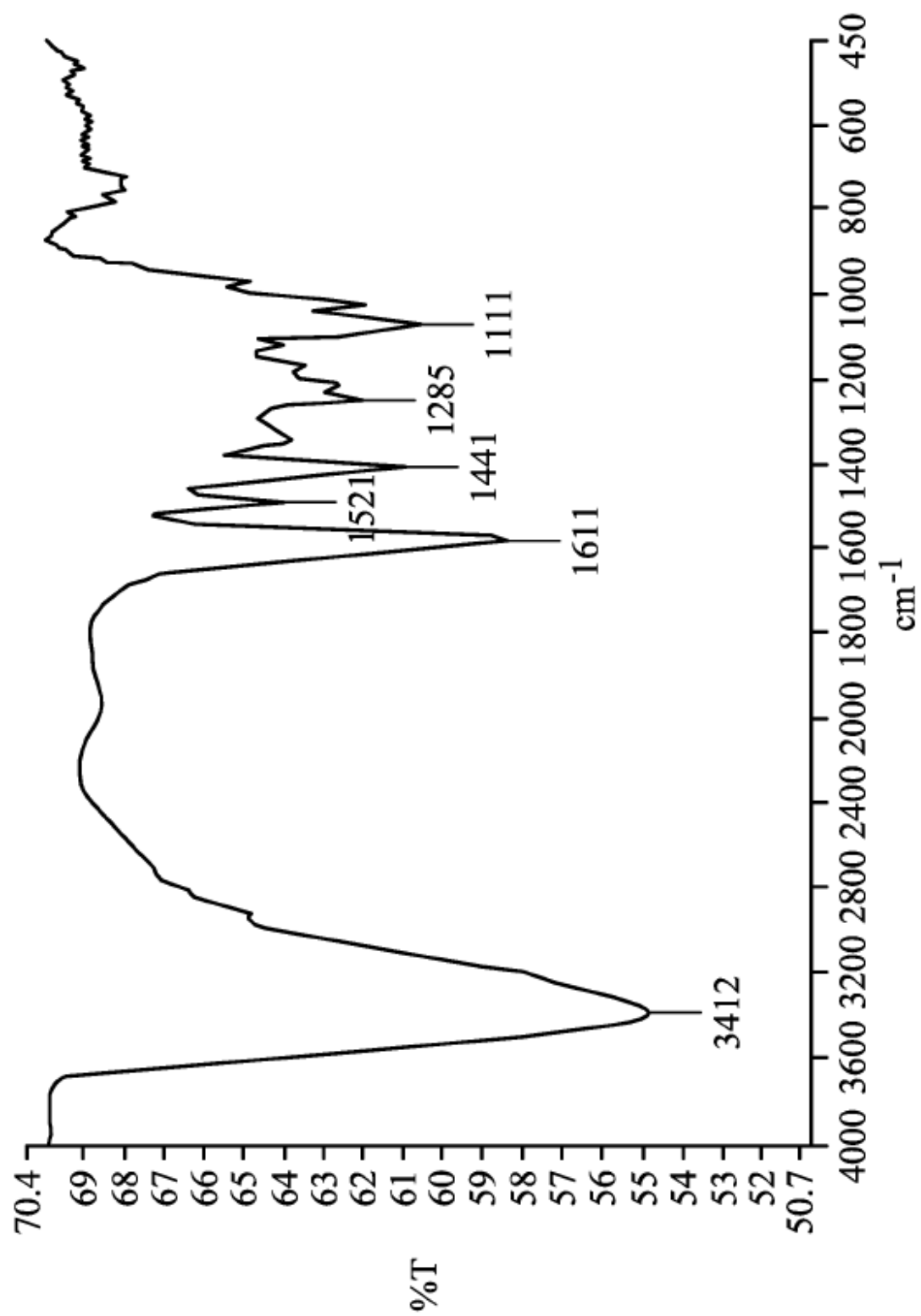


FIG. 3

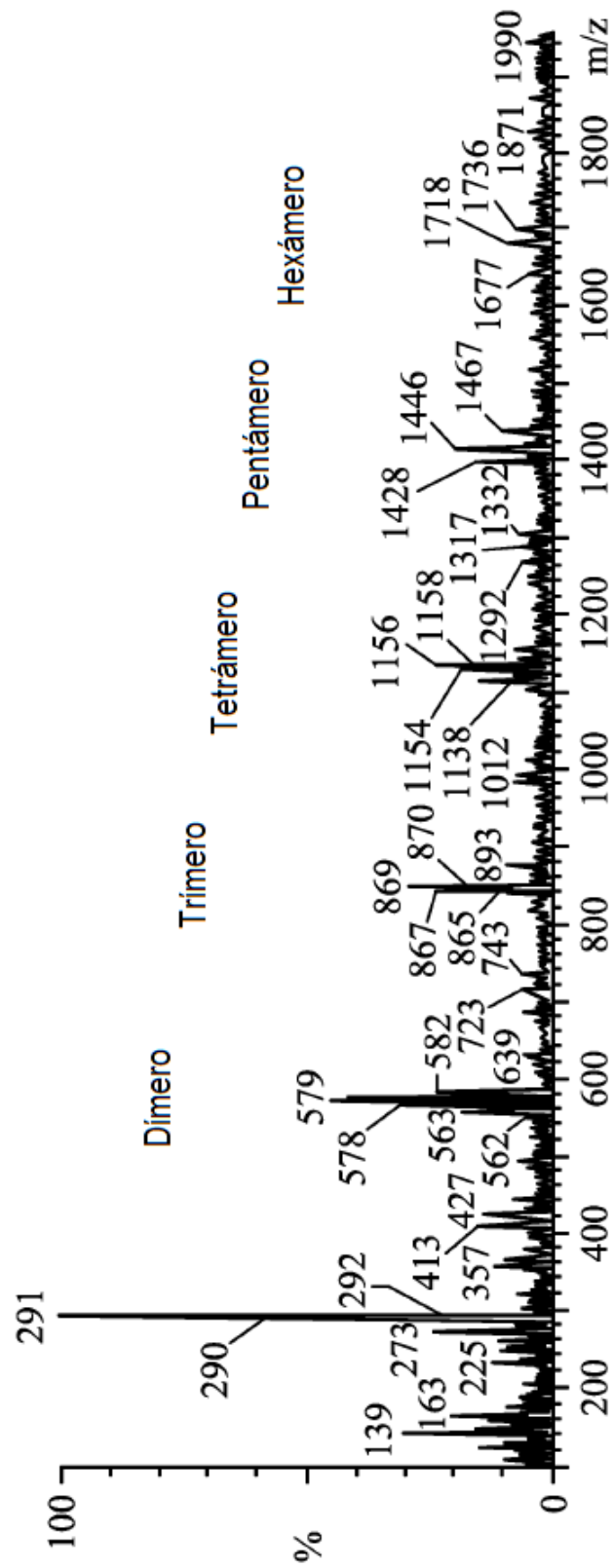


FIG. 4A

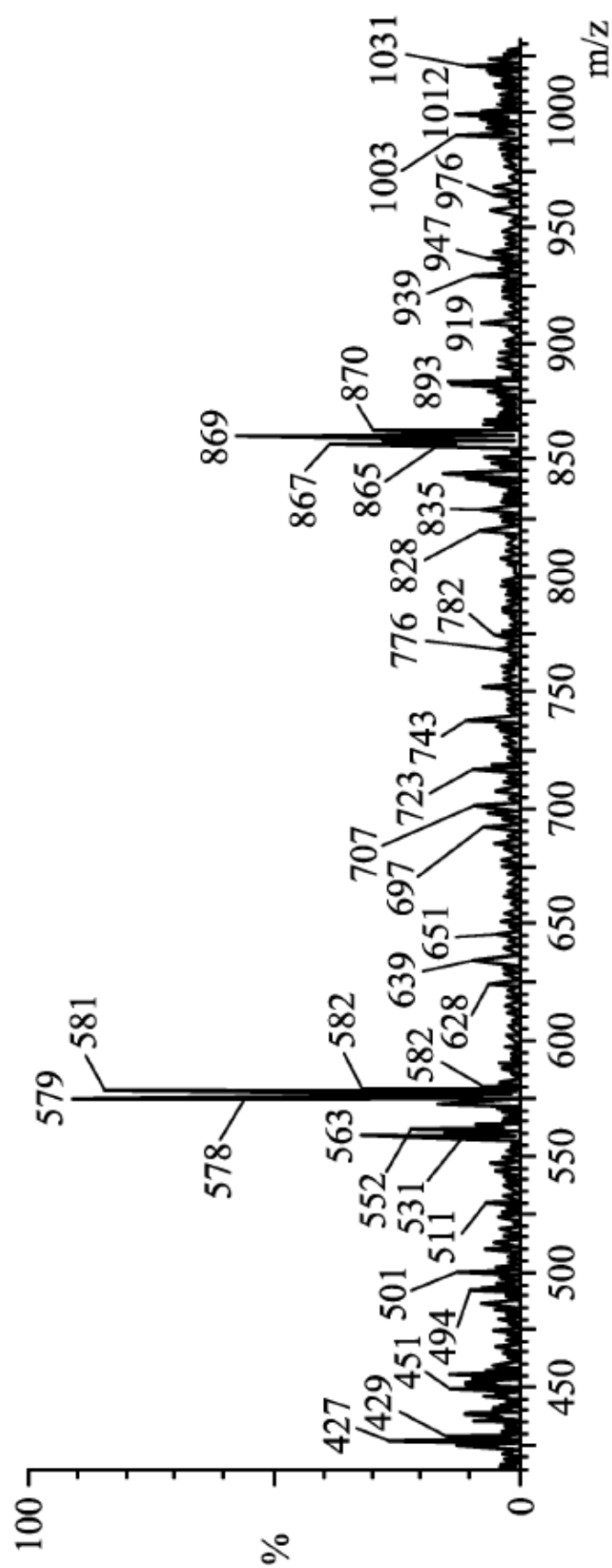


FIG. 4B

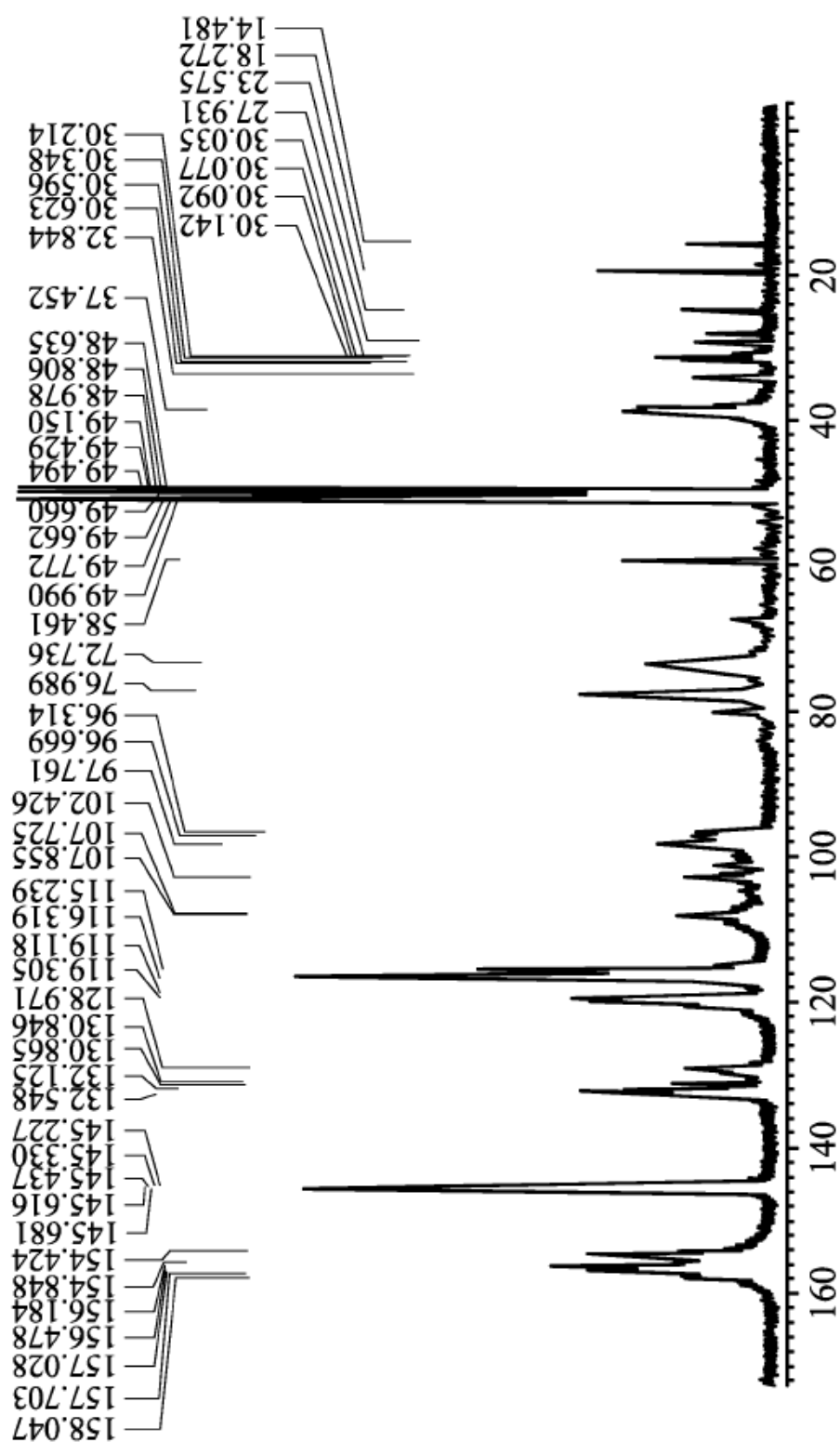


FIG. 5A

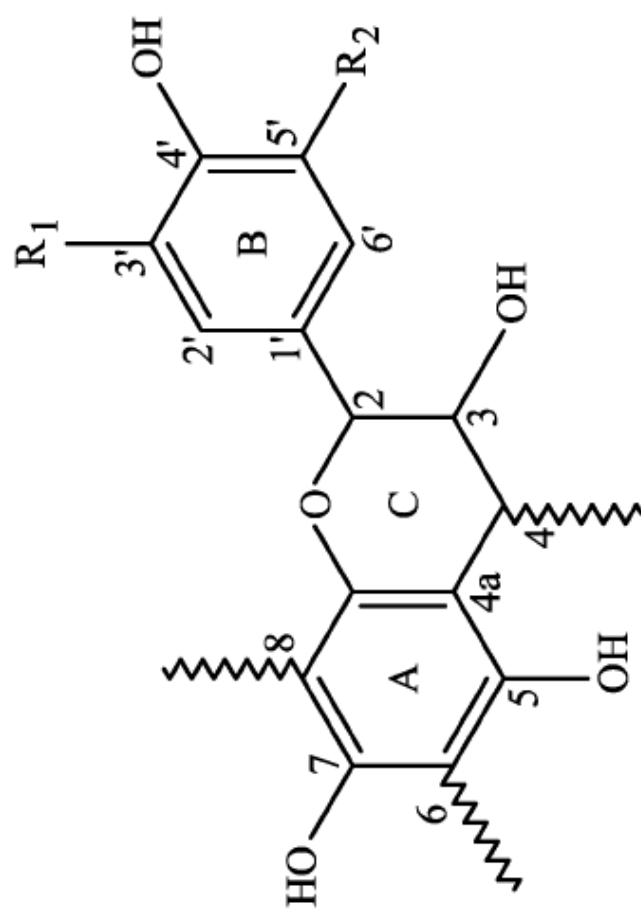


FIG. 5B

| gnal (ppm)  | Definición                                                          |
|-------------|---------------------------------------------------------------------|
| 154.4-158.1 | C5, C7, C8a, anillo-A                                               |
| 145.2-145.7 | C3' & C4' Proantocianidina (catequina/epicatequina)(sin delfindina) |
| 132.1-132.5 | C1'                                                                 |
| 131         | C2'                                                                 |
| 119         | C3'                                                                 |
| 116         | C4'                                                                 |
| 115         | C5'                                                                 |
| 107         | C6'                                                                 |
| 102         | C4a                                                                 |
| 96.3-97.9   | C6, C8                                                              |
| 72.7-77     | C2(trans), C2(cis), C3(trans & cis)                                 |
| 67.3        | C3                                                                  |
| 37.4        | C4                                                                  |

FIG. 5C

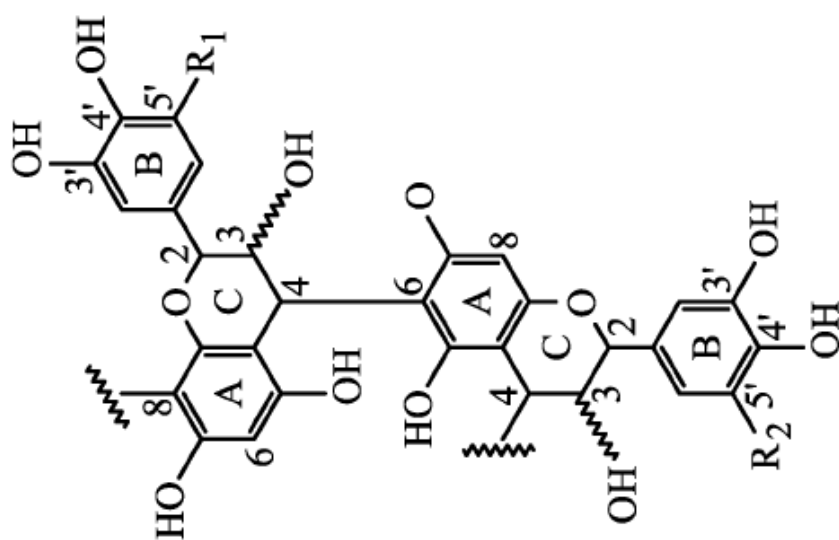


FIG. 6B

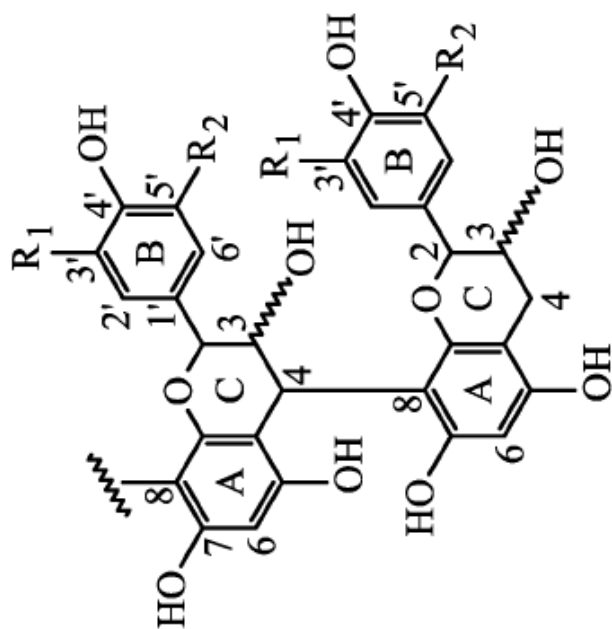


FIG. 6A

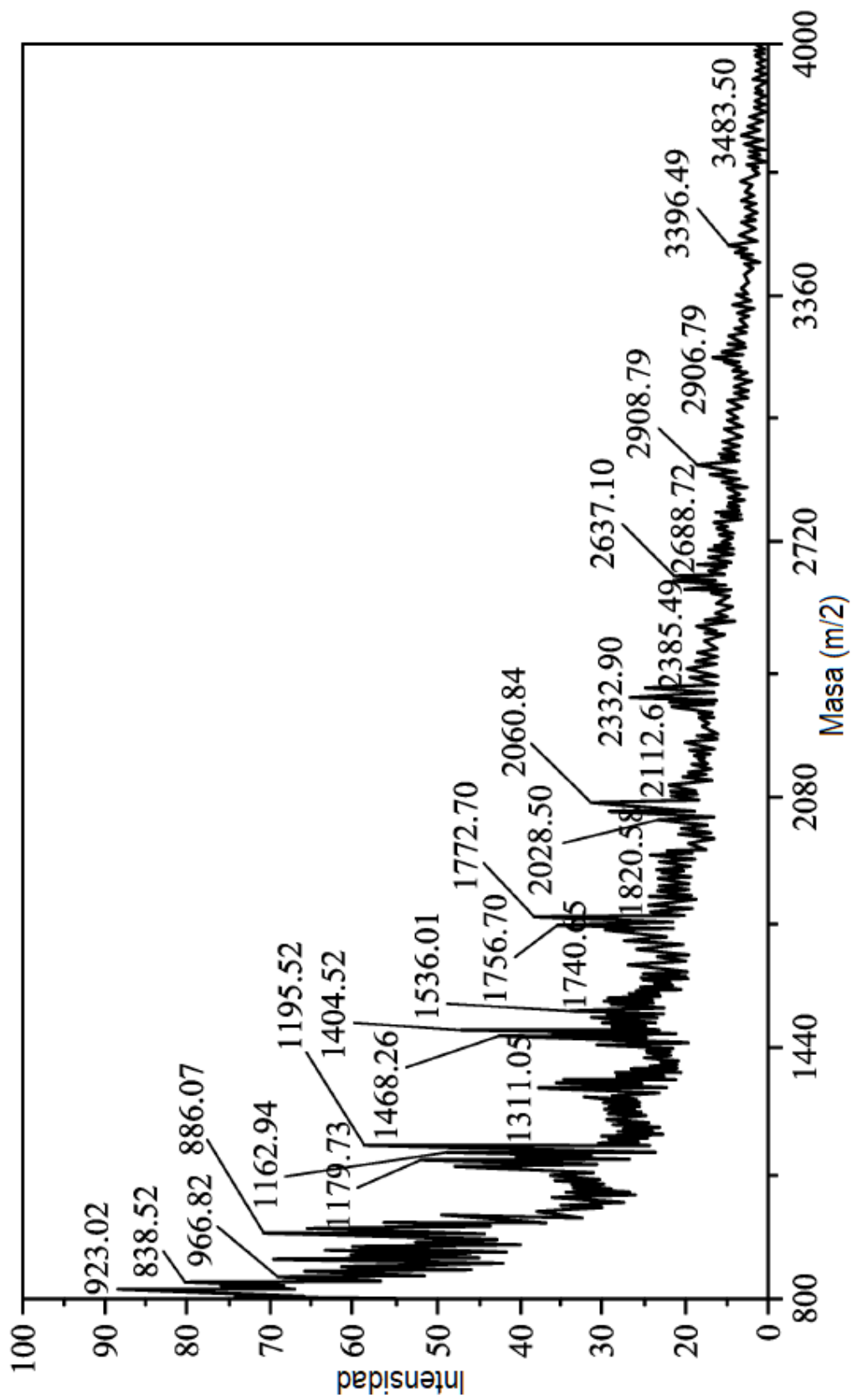


FIG. 7A

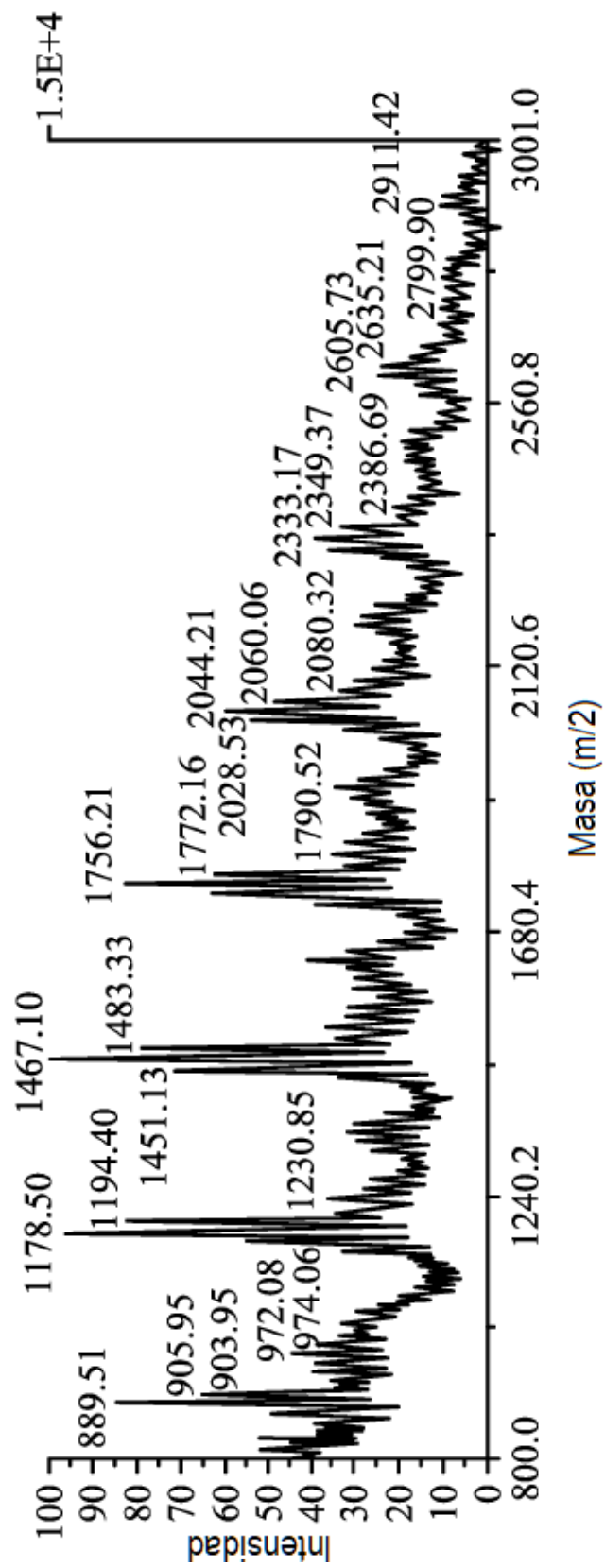


FIG. 7B

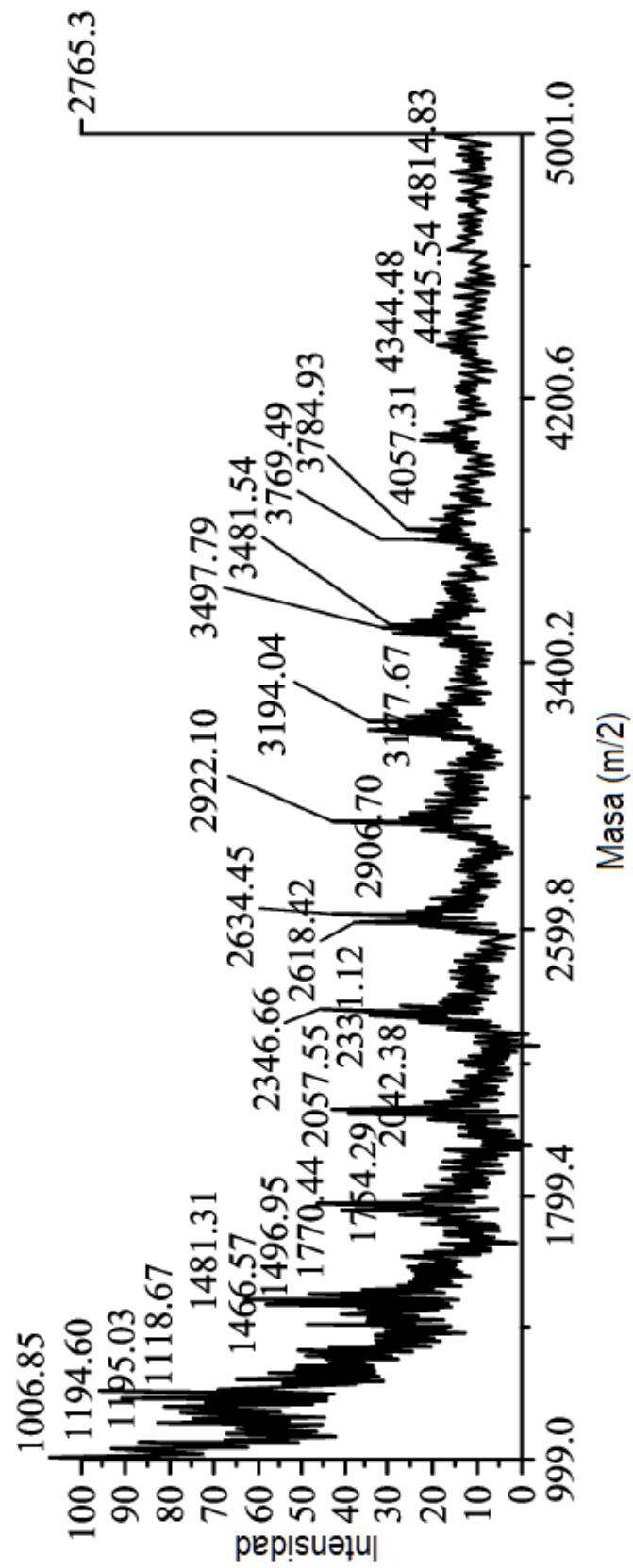


FIG. 7C

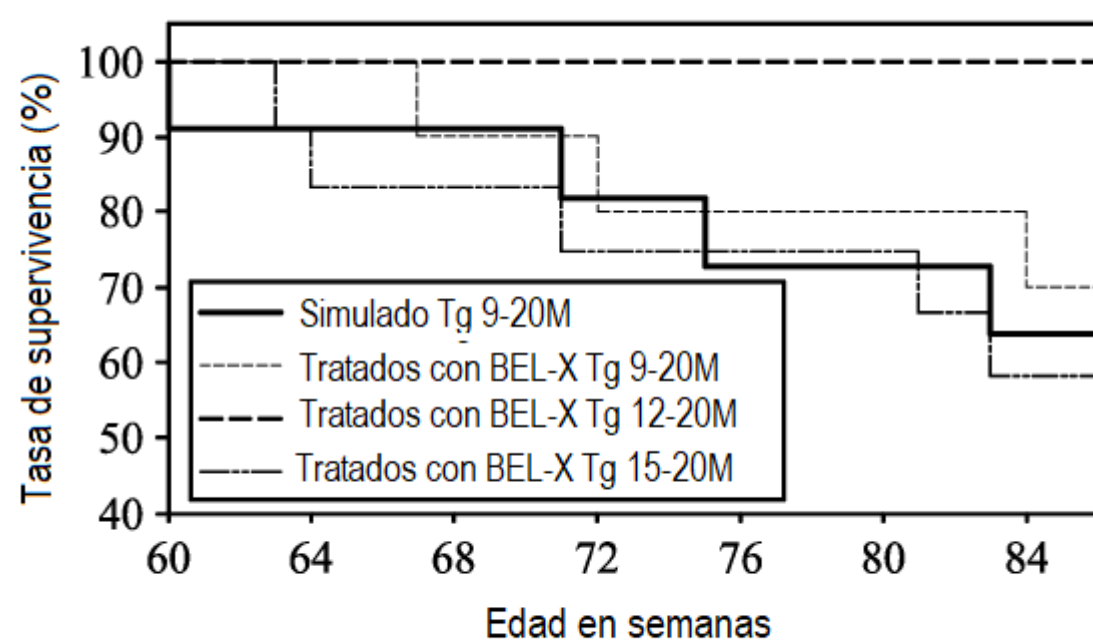


FIG. 8

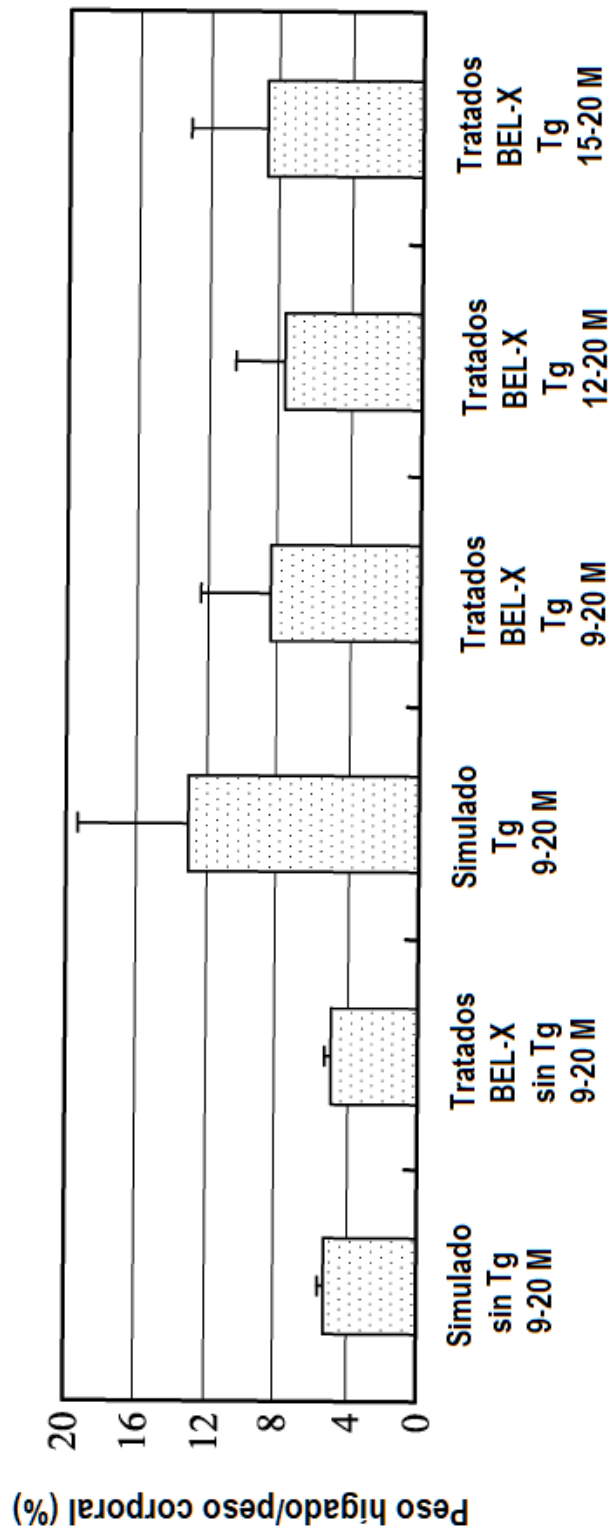
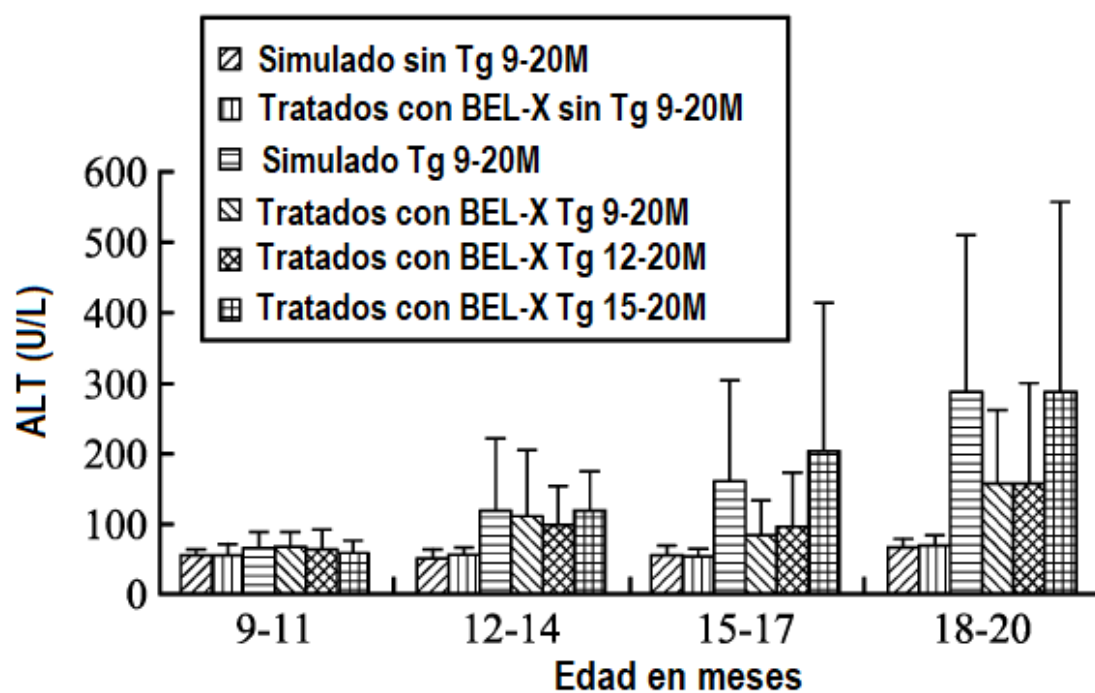
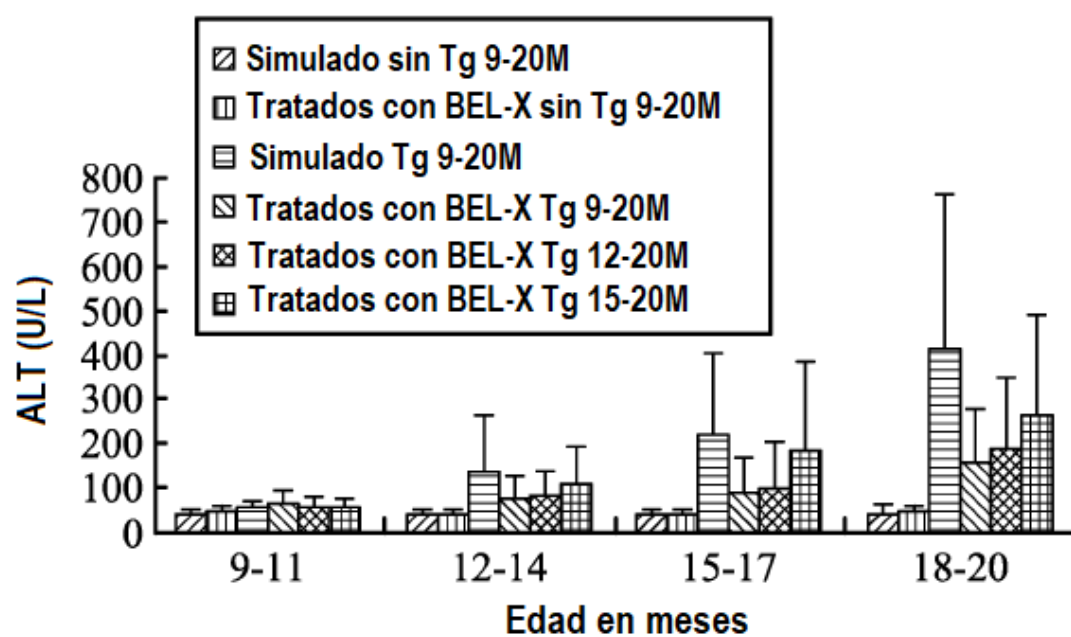


FIG. 9



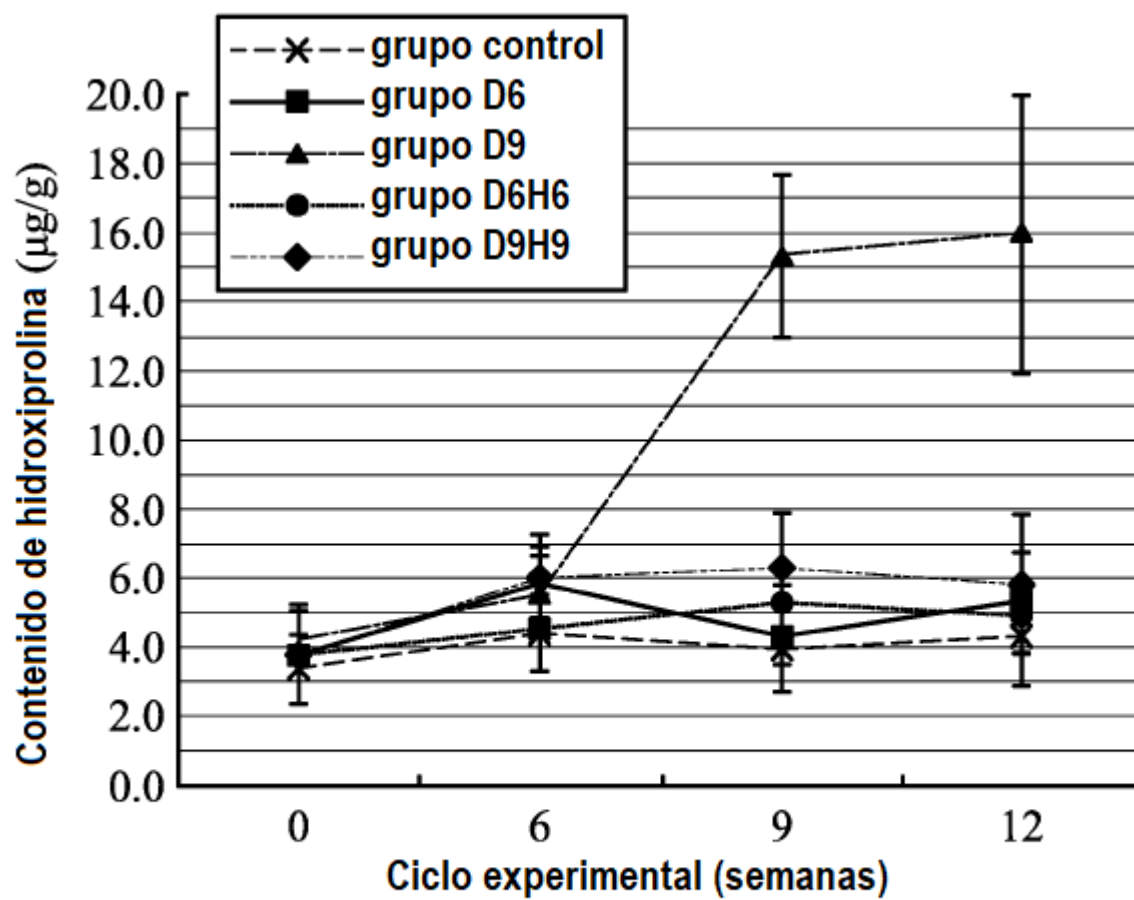


FIG. 12

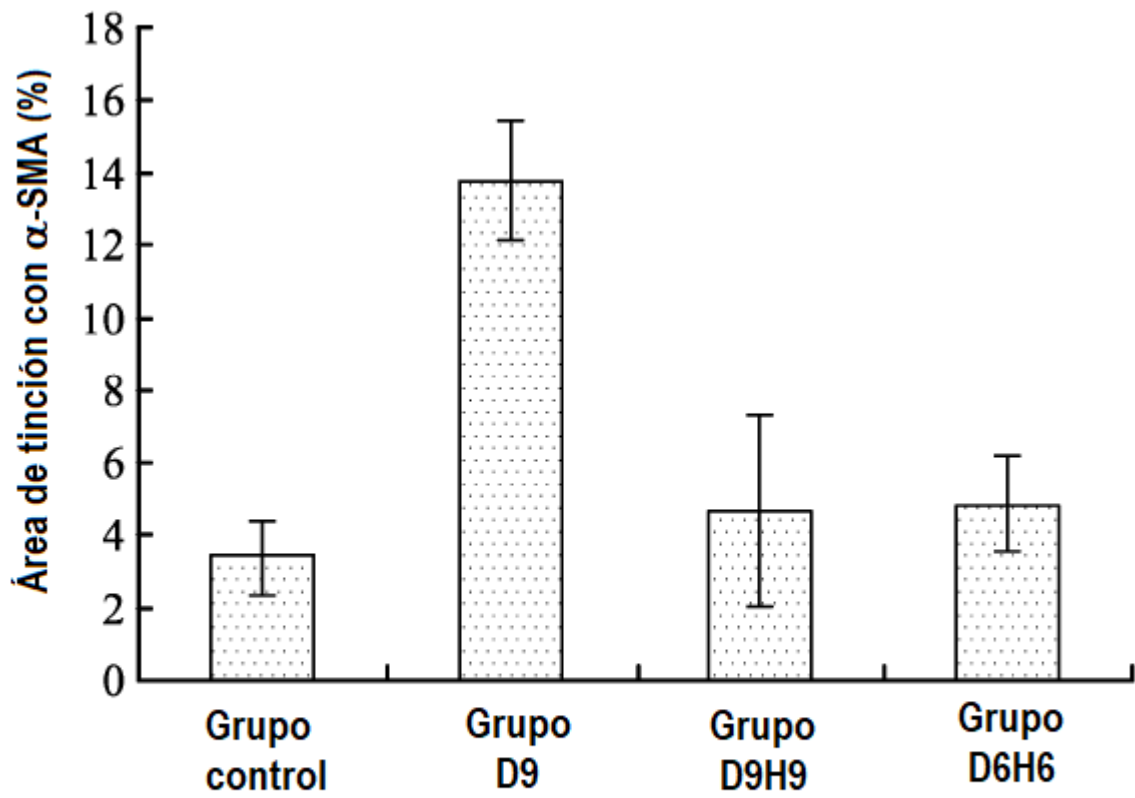


FIG. 13

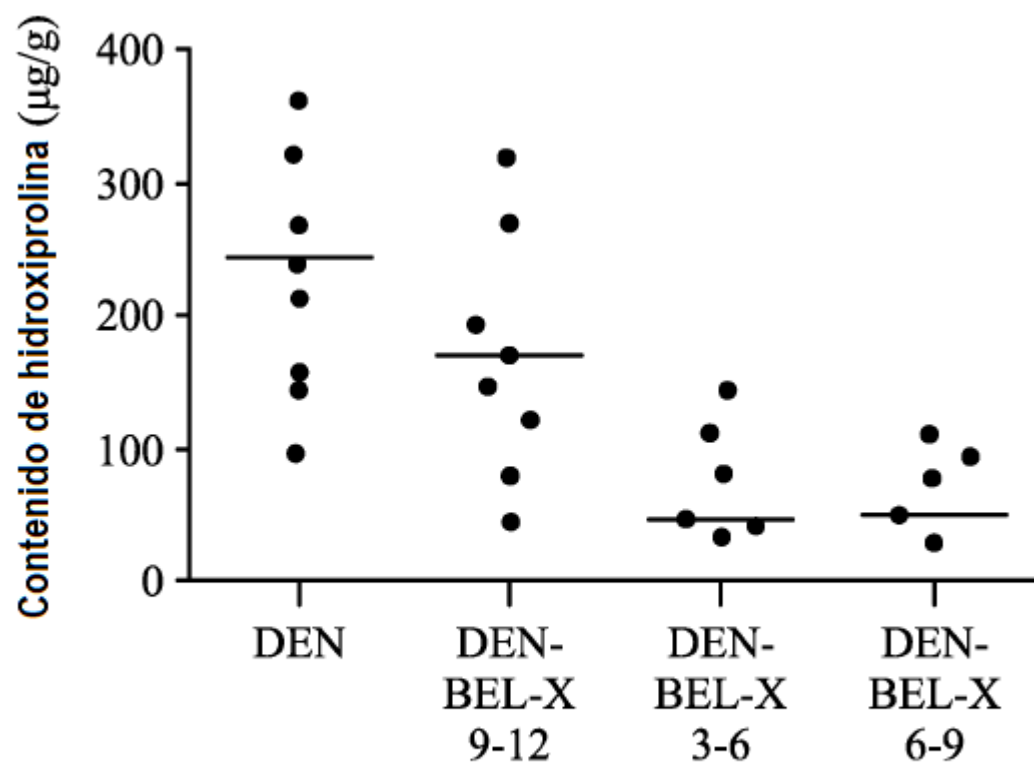


FIG. 14

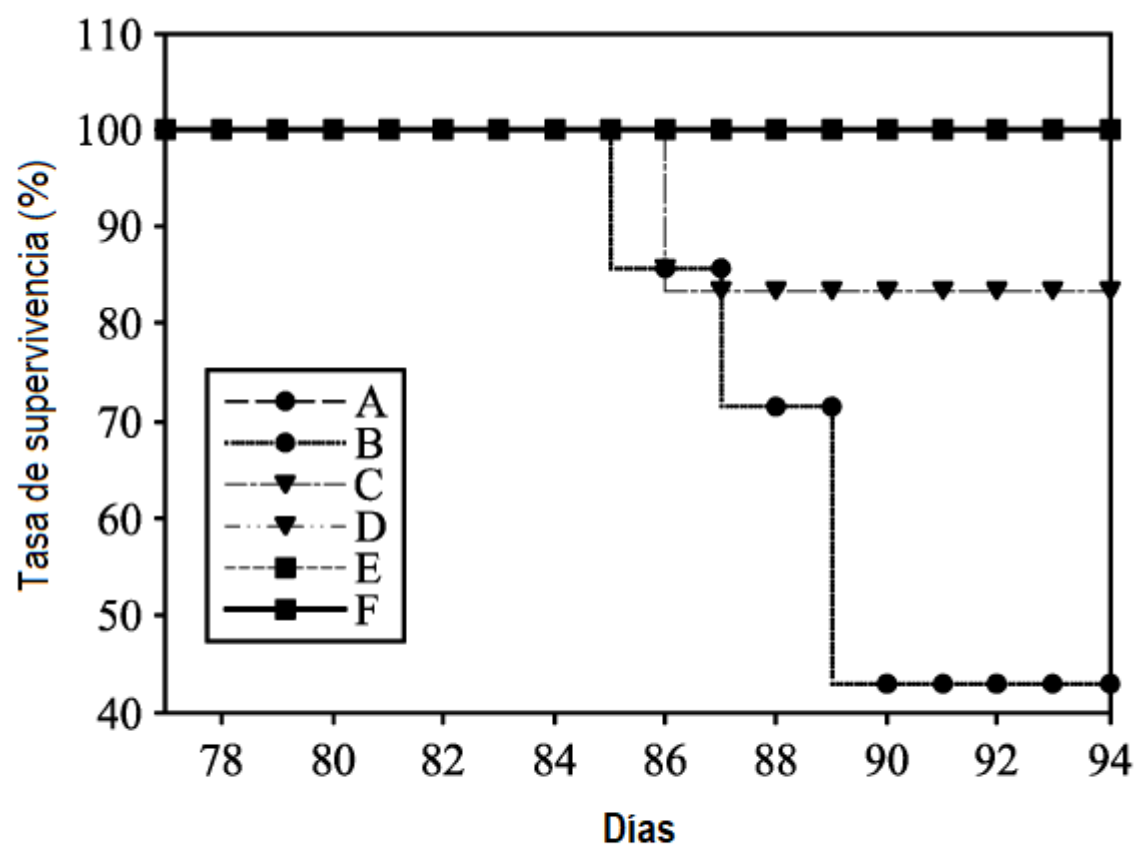


FIG. 15

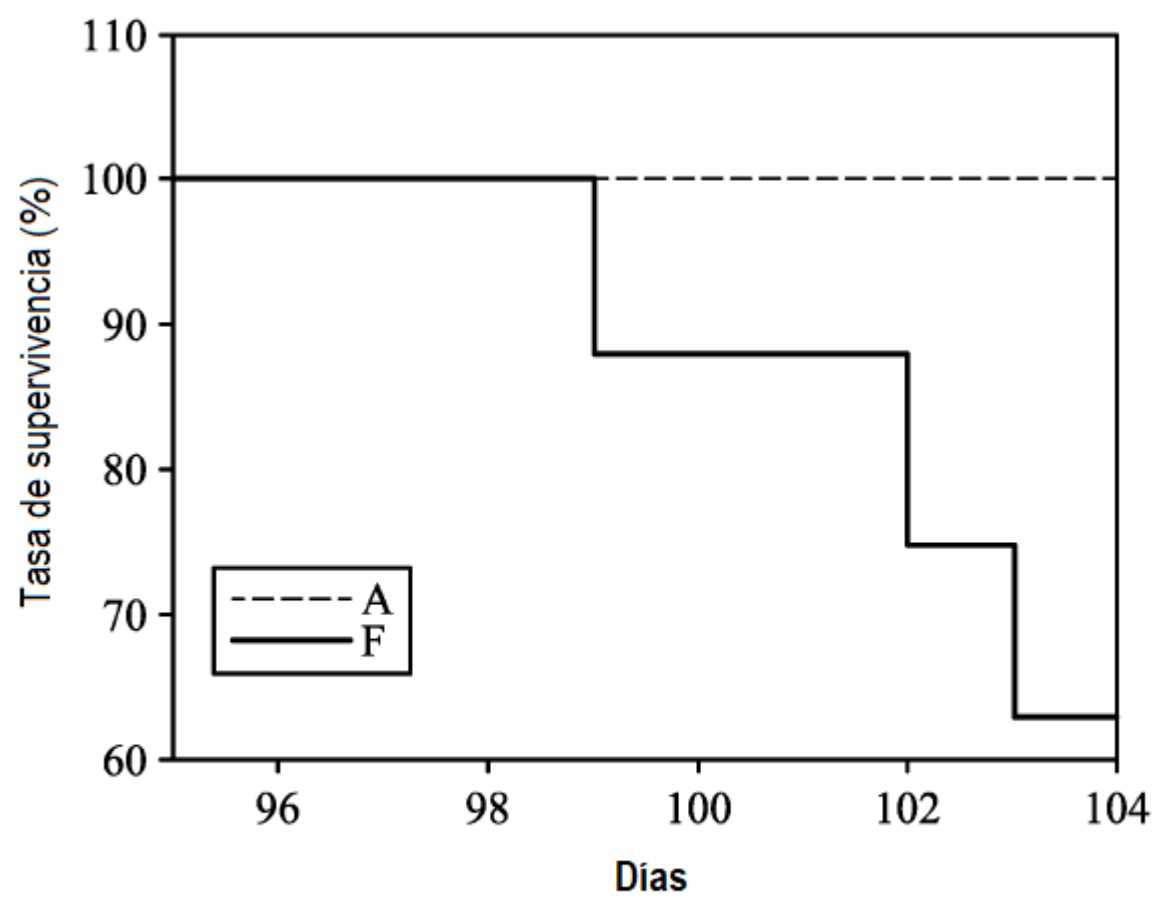


FIG. 16

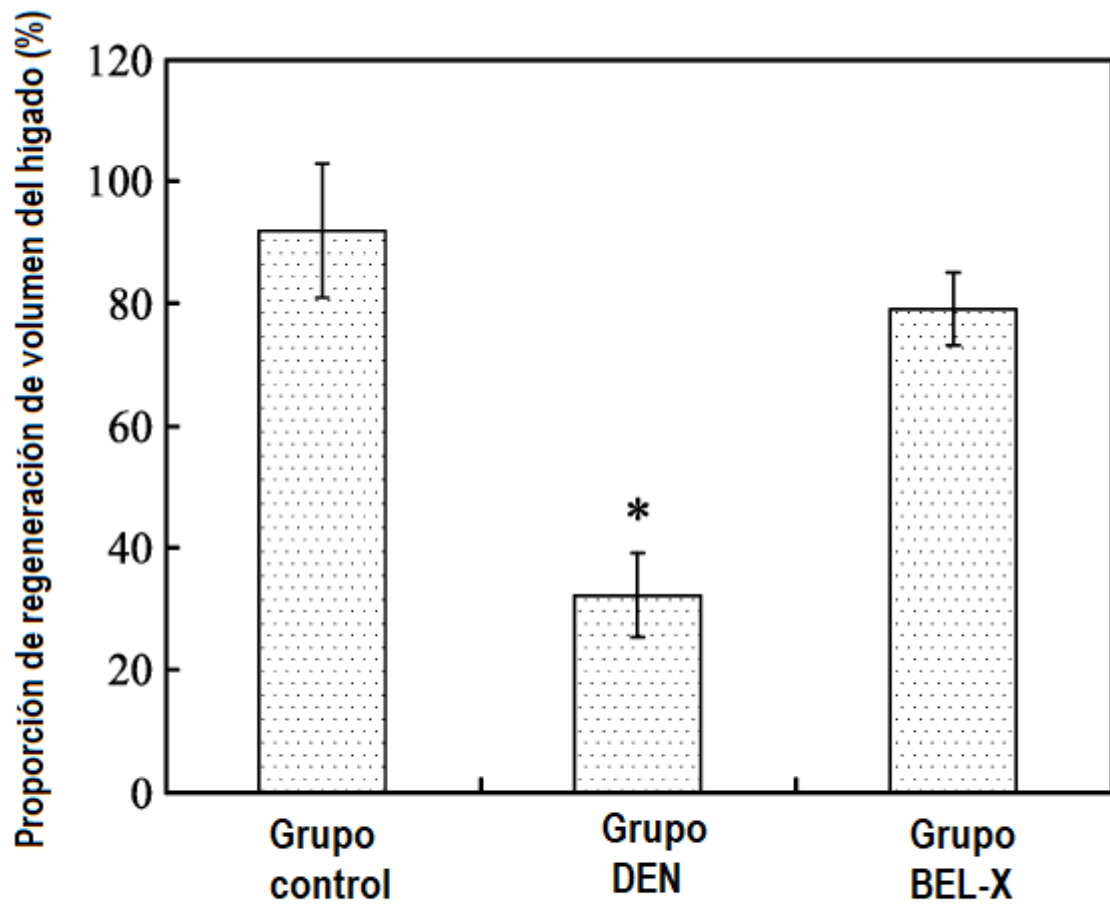


FIG. 17