

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 878**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/88** (2006.01)

**A61K 36/28** (2006.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**A61P 13/12** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

**A61K 8/60** (2006.01)

**A61Q 19/02** (2006.01)

**A61K 8/97** (2007.01)

**A61K 31/7032** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2014** **E 14170846 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019** **EP 2810651**

54 Título: **Extractos de plantas enriquecidos con galactolípidos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**04.06.2013 TW 102119755**

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

**12.05.2020**

73 Titular/es:

**ACADEMIA SINICA (100.0%)  
128, Academia Road, Section 2  
Nakang, Taipei 115, TW**

72 Inventor/es:

**SHYUR, LIE-FEN;  
FENG, JIA-HUA y  
APAYA, MARIA KARMELLA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 759 878 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

Extractos de plantas enriquecidos con galactolípidos y usos de los mismos

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un extracto de plantas enriquecido con galactolípidos, especialmente a un extracto de *crassocephalum rabens* (Juss. Ex Jacq.) S. Moore, *gynura divaricata* subsp. *formosana* y *murdannia bracteata* (C. B. Clarke) J. K. Morton ex D. Y. Hong. En particular, la presente invención se refiere a los usos del extracto de plantas para producir composiciones para uso en la prevención o el tratamiento de la hepatitis fulminante aguda o sepsis o el uso no médico para el blanqueamiento de la piel.

Descripción de la técnica relacionada

15 Recientemente, las investigaciones indican que muchos ingredientes naturales de plantas (fitoquímicos) tienen diversos efectos curativos. Por ejemplo, Phan van Kiem et al. publicaron en su artículo en Archives of Pharmacal Research, vol. 35, páginas 2135-2142 de que los galactolípidos de ficus microcarpa pueden inhibir la secreción de IL-8 inducida por TNF- $\alpha$  y, por lo tanto, pueden proporcionar efectos antiinflamatorios. El documento WO 2008/105436 A1 divulga además que el extracto completo de *Crassocephalum crepidoides* es bioactivo y tiene un efecto de supresión del factor de necrosis tumoral ( $\alpha$ ) (TNF- $\alpha$ ), un efecto de supresión de prostaglandina sintasa 2 (COX-2) y un efecto antiinflamatorio. El documento WO 2012/021068 A1 divulga una composición para el tratamiento de la hiperlipidemia y/o hipercolesterolemia, que comprende alcaloides de pirroizilidina y preferiblemente partes enteras de y/o una lixiviación acuosa o etanólica de una planta de la familia Asteraceae, tal como *Gynura divaricata* DC, en combinación con una o más otras sustancias reductoras de lípidos y/o colesterol. Mun Fei Yam et al. enseñan en su publicación en el Journal of Acupuncture and Meridian Studies, vol. 3, páginas 197-202 de que un extracto concentrado de metanol de *Murdannia bracteata* (MB) posee actividades antioxidantes y de depuración de radicales libres, inhibe la elevación de los niveles séricos de ALT y AST y, por lo tanto, podría usarse para proteger el hígado. Nakamura Seikou et al., Chemical and Pharmaceutical Bulletin, vol. 59, páginas 1010-1028 se refieren a las estructuras químicas y las investigaciones ex vivo del efecto hepatoprotector de los constituyentes de un extracto metanólico de las hojas de *Salacia chinensis*. La publicación de Harry Martin et al. en Bioscience Reports, vol. 230, páginas 151f. divulga que dLGG es capaz de unirse de manera no covalente a PPAR $\gamma$ , lo que puede contribuir a los efectos antiinflamatorios de dLGG. El documento CN 101 152 340 A divulga además una composición de medicina tradicional china para aves de corral, que comprende *Hypericum perforatum*, *Solanum dulcamara*, *Murdannia bracteata* y *Bidens*, en la que dicha composición tiene actividad antiinflamatoria, hepatotrópica, virucídica y antibacteriana y es adecuada para el tratamiento del virus de aves de corral e infecciones bacterianas de aves de corral, tales como la hepatitis viral de pato y la enfermedad de Newcastle, con una alta tasa de curación.

De aquí en adelante, hay otras tres plantas comunes en Taiwán *crassocephalum rabens* (Juss. Ex Jacq.) S. Moore, *gynura divaricata* subsp. *formosana* y *murdannia bracteata* (C. B. Clarke) J. K. Morton ex D. Y. Hong para ilustración.

40 *Crassocephalum rabens* (Juss. Ex Jacq.) S. Moore (en adelante "CR") es un vegetal silvestre ordinario en Taiwán y tiene una gran fecundidad y adaptabilidad. El CR pertenece al género *crassocephalum* de la familia de las axteraceae. Sabe a antimonio y se puede recolectar durante todo el año. Especialmente, el sabor del CR es delicioso cuando se recolecta antes de florecer. Los efectos médicos del CR son conocidos por aliviar la fiebre, fortalecer el estómago, reducir el anasarca y tratar el dolor de estómago. Además, los documentos US 2008/152737 A1 y una publicación correspondiente de C.-C. Hou et al. en Cancer Research, vol. 67, páginas 6907-6915 divulgan un extracto de *C. rabens*, composiciones con los mismos y métodos que usan los mismos para tratar el cáncer y los trastornos inflamatorios asociados con la actividad de NF- $\kappa$ B y sus mediadores inflamatorios corriente abajo, NO, iNOS, COX-2 y PGE<sub>2</sub>.

50 *Gynura divaricata* subsp. *formosana* (en adelante "GD"), otro nombre de vegetal blanco-rojo, es una planta medicinal que pertenece al género *gynura* de la familia de las axteraceae. Es una especie endémica en Taiwán que crece en la región costera y, algunas veces, en las montañas de baja elevación de Taiwán. Se afirma que el tallo y la hoja jóvenes de GD que se pueden usar como alimento tienen efectos para disminuir la inflamación, aliviar la fiebre, la desintoxicación, la diuresis, disminuir la presión arterial, etc.

60 *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) J. K. Morton ex D. Y. Hong (en adelante "MB") que es una hierba perenne pertenece al género de monocotiledóneas de la familia Commelinaceae que crece principalmente al lado del arroyo del valle, el agua del valle o la tierra de arena. Tiene valores médicos y a menudo se usa para reducir el esputo, tratar hemorroides o tratar enfermedades de infección crónica de ganglios linfáticos del cuello, enfermedades de infección aguda supurativa del folículo piloso, glándulas sebáceas o glándulas sudoríparas.

65 Sin embargo, los estudios recientes todavía son limitados sobre los ingredientes activos y los mecanismos de las tres plantas mencionadas. No existen referencias o patentes que revelen que un extracto o un compuesto purificado de las tres plantas mencionadas anteriormente tenga la capacidad de tratar o prevenir indicaciones tales como hepatitis o septicemia, etc. y blanqueamiento de la piel.

Otra forma, la estructura del galactoséipido, también llamado glucoglicerolípido, que existe en gran medida en la naturaleza, tiene dos ácidos grasos esterificados en la posición sn-1 y sn-2 del glicerol y una a cuatro galactosas en la posición sn-3. Muchos glucoglicerolípidos naturales o de síntesis son conocidos por su bioactividad específica, incluidos los antivirales, antitumorales, antiinflamatorios y la depresión inmune, etc. Pero este tipo de compuesto todavía no está claro sobre sus efectos a otras adaptaciones y mecanismos moleculares de su bioactividad.

Resumen de la invención

De acuerdo con las deficiencias de la técnica anterior, un propósito de la presente invención es proporcionar una composición de aditivo farmacéutico, saludable o nutricional para uso en la prevención o el tratamiento de la hepatitis fulminante aguda disminuyendo los niveles séricos de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), que comprende un vehículo farmacéutico, saludable o alimentario aceptable, y una cantidad efectiva de un ingrediente bioactivo, en el que el ingrediente bioactivo es un extracto de plantas enriquecido con galactolípidos o un compuesto purificado obtenido de la purificación del extracto de plantas enriquecido con galactolípidos, en el que el extracto de plantas enriquecido con galactolípidos se extrae de una muestra de planta usando agua, metanol o etanol y luego usando acetato de etilo para separar un extracto de acetato de etilo por partición, luego eluyendo además el extracto de acetato de etilo mediante un regulador de elución de alcohol para tener una fracción enriquecida con galactolípidos, en donde la fracción enriquecida en galactolípidos es una fracción enriquecida con 1,2-di-O- $\alpha$ -linolenil-3-O- $\beta$ -lactopiranosil-sn-glicerol (dLGG), en la que la muestra de planta se selecciona de un grupo que consiste en *Gynura divaricata* subsp. *formosana*, *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) J. K. Morton ex D. Y. Hong y *Crassocephalum rabens* S. Moore, y el alcohol es un porcentaje en volumen del 5% al 20% del regulador de elución de alcohol.

En un ejemplo de esta presente divulgación, el extracto de planta puede comprender además un espectro de extracto de planta. Por ejemplo, el extracto de la planta es de *Gynura divaricata* subsp. *Formosana*, puede comprender además una huella química de *Gynura divaricata* subsp. *formosana*. El extracto de la planta es de *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) J. K. Morton ex D. Y. Hong, además puede comprender una huella de *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) J. K. Morton ex D. Y. Hong.

En un ejemplo de esta invención, la relación del alcohol en el regulador de elución de alcohol es aproximadamente 5% ~ 15%. En otro ejemplo de esta invención, la relación del alcohol en el regulador de elución de alcohol es aproximadamente 5% ~ 10%. En otro ejemplo de esta invención, la relación del alcohol en el regulador de elución de alcohol es de aproximadamente 10% ~ 15%.

En una realización de esta presente invención, el regulador de elución de alcohol puede comprender diclorometano y metanol, metanol y agua, metanol y acetonitrilo, o metanol y acetona.

En un ejemplo de esta invención, la relación de diclorometano y metanol es 9:1 en un regulador de elución de metanol. El regulador de elución de metanol con una relación de 9:1 se puede usar para la elución, por ejemplo: para tener un extracto de éter inferior de *Gynura divaricata* subsp. *Formosana*.

En un ejemplo de esta invención, la relación de diclorometano y metanol es 12:1 en el regulador de elución de metanol. El regulador de elución de metanol con una relación de 12:1 se puede usar para la elución, por ejemplo: para tener un extracto de éter inferior de *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) J. K. Morton ex D. Y. Hong.

En una realización de esta presente invención, la fracción enriquecida con galactolípidos puede purificarse adicionalmente mediante una cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa para tener una fracción bioactiva.

La fracción bioactiva puede comprender un espectro de cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (HPLC) de *Crassocephalum rabens* S. Moore que se muestra en la figura 3.

En una realización de esta presente invención, la fracción enriquecida con galactolípidos se puede eluir mediante un regulador de elución de alcohol para tener la fracción bioactiva, en donde el alcohol es un porcentaje en volumen del 100% al 70% del regulador de elución de alcohol.

En esta presente invención, la fracción enriquecida con galactolípidos es una fracción enriquecida con 1,2, di-O- $\alpha$ -linolenil-3-O- $\beta$ -galactopiranosil-sn-glicerol (dLGG).

En esta presente invención, el objeto purificado es 1,2, di-O- $\alpha$ -linolenil-3-O- $\beta$ -galactopiranosil-sn-glicerol (dLGG).

Otro propósito de la presente invención es proporcionar una composición de aditivo farmacéutico, saludable o nutricional para uso en la prevención o el tratamiento de la sepsis y la lesión renal aguda inducida por sepsis asociada con una mayor expresión del factor inducible por hipoxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), que comprende:

una cantidad efectiva de un ingrediente bioactivo, en el que el ingrediente bioactivo es un extracto de plantas enriquecido con galactolípidos o un objeto purificado del mismo, en el que la fracción enriquecida con galactolípidos es una fracción enriquecida con 1,2, di-O- $\alpha$ -linolenoil-3-O- $\beta$  -galactopiranosil-sn-glicerol (dLGG); y

5 un vehículo farmacéutico, saludable o alimentario aceptable.

En una realización de esta presente invención, el objeto purificado es 1,2, di-O- $\alpha$ -linolenoil-3-O- $\beta$ -galactopiranosil-sn-glicerol (dLGG).

10 Otro propósito de la presente invención es proporcionar una composición para el uso no médico del blanqueamiento de la piel, que comprende:

15 una cantidad efectiva de un ingrediente bioactivo, en el que el ingrediente bioactivo es un extracto de plantas enriquecido con galactolípidos o un objeto purificado del mismo, en el que la fracción enriquecida con galactolípidos es una fracción enriquecida con 1,2, di-O- $\alpha$ -linolenoil-3-O- $\beta$  -galactopiranosil-sn-glicerol (dLGG); y

un vehículo farmacéutico, saludable o alimentario aceptable.

20 En esta presente invención, el objeto purificado es 1,2, di-O- $\alpha$ -linolenoil-3-O- $\beta$ -galactopiranosil-sn-glicerol (dLGG).

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 muestra la huella química de la fracción enriquecida en galactolípidos de *Gynura divaricata* subsp. formosana (en adelante "GDE"). dLGG se determinó como un componente principal en la fracción, en la que:

(A) es el cromatograma de iones totales de la fracción bioactiva GDE.

30 (B) son las estructuras químicas de los constituyentes de monogalactosildiacilglicerol (1-5) de GDE.

La Figura 2 muestra la huella química de la fracción enriquecida en galactolípidos de *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) J. K. Morton ex D. Y. Hong (en adelante "MBE"). dLGG se determinó como un componente principal en la fracción, en la que:

35 (A) es el cromatograma de iones totales de la fracción bioactiva MBE.

(B) son las estructuras químicas de los componentes de monogalactosildiacilglicerol (1-7) de MBE.

40 La Figura 3 muestra el espectro de HPLC de la solución de acetato de etilo de *Crassocephalum rabens* (Juss. Ex Jacq.) S. Moore (en adelante "CR-EA").

45 La Figura 4 muestra los datos de efectividad de las fracciones de galactolípidos enriquecidas con dLGG de *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) J. K. Morton ex D. Y. Hong (MBE) y *Gynura divaricata* Subsp. Formosana (GDE) para el uso en el tratamiento de la lesión hepática inducida por LPS/D-GalN en ratones. Se demostró que las fracciones de galactolípidos enriquecidas con dLGG extraídas de MB (MBE) y GD (GDE) son efectivas para reducir la lesión hepática y la hepatitis fulminante aguda en ratones inducidos por LPS/D-GalN, en donde:

50 (A) muestra los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) en los grupos de izquierda a derecha del vehículo (-), ratones expuestos a LPS/D-GalN (LPS/D-GalN+), ratones expuestos a LPS/D-GalN con SM (LPS/D-GalN+, Post-SM+), ratones expuestos a LPS/D-GalN con extracto de planta MBE (LPS/D-GalN+, Post-MBE+), ratones expuestos a LPS/D-GalN con extracto de planta GDE (LPS/D-GalN+, Post-GDE+). Los datos son medias  $\pm$  S.E.M. de resultados de 6 ratones por grupo de tratamiento. Diferentes letras indican la diferencia significativa dentro de los grupos probados ( $P < 0.05$ ).

55 (B) muestra la tinción H&E y la histología de secciones de hígado de ratones tratados.

La Figura 5 muestra la efectividad de dLGG como agente terapéutico para uso en el tratamiento de la hepatitis fulminante aguda de ratones expuestos a LPS/D-GalN, en donde:

60 (A) muestra los niveles séricos de aspartato aminotransferasa (AST) y ALT en los grupos de izquierda a derecha del vehículo (-), ratones expuestos a LPS/D-GalN (LPS/D-GalN +), ratones expuestos a LPS/D-GalN con SM (LPS/D-GalN+, Post-SM+), ratones expuestos a LPS/D-GalN con dLGG (LPS/D-GalN+, Post-dLGG+). Los datos son medias  $\pm$  S.E.M. de resultados de 6 ratones por grupo de tratamiento. Diferentes letras indican la diferencia significativa dentro de los grupos probados ( $P < 0.05$ ).

65

(B) muestra la tinción H&E y la histología de secciones de hígado de ratones tratados. Se muestra una imagen representativa de cada grupo de tratamiento.

5 (C) muestra el resultado del ensayo TUNEL de tejidos hepáticos. Se muestra una imagen representativa de cada grupo de tratamiento. Las células parduzcas son células apoptóticas positivas en TUNEL.

La figura 6 muestra la efectividad de CR-EA, dLGG y simvastatina (simva) para su uso en la prevención y el tratamiento de la inflamación y sepsis inducidas por LPS en ratones. Los datos son la media  $\pm$  SEM (n= 4). Diferentes letras indican la diferencia significativa dentro de los grupos probados (P <0.05, ANOVA).

10 (A) muestra los niveles séricos de IL-6 en los diferentes grupos de tratamiento.

(B) muestra los niveles séricos de TNF- $\alpha$  en los diferentes grupos de tratamiento.

15 (C) muestra secciones de hígado con tinción de inmunohistoquímica F4/80 para ilustrar la infiltración de células de macrófagos. Se muestran imágenes representativas.

20 (D) muestra una comparación cuantitativa entre los grupos de tratamiento determinados por las intensidades medias de las células positivas para F4/80.

La figura 7 muestra la efectividad de CR-EA, dLGG y simvastatina (simva) en el uso para prevenir y tratar la inflamación y la sepsis inducida por LPS en ratones. Los datos son la media  $\pm$  SEM (n = 4). Diferentes letras indican la diferencia significativa dentro de los grupos probados (P <0.05, ANOVA).

25 (A) muestra los niveles séricos de AST en los diferentes grupos de tratamiento.

(B) muestra los niveles séricos de ALT en los diferentes grupos de tratamiento.

30 (C) muestra las secciones de hígado teñidas con H&E. Ilustra los resultados de la morfología del tejido hepático y la infiltración de glóbulos rojos y células inflamatorias en diferentes grupos tratados de ratones con LPS. Se muestran imágenes representativas.

La figura 8 muestra la efectividad de CR-EA, dLGG y simvastatina (simva) en el uso para prevenir y tratar la inflamación y sepsis inducida por LPS en ratones, en donde:

35 (A) muestra histología renal en los diferentes grupos de tratamiento de ratones expuestos a LPS por secciones de riñón teñidas con H&E. Se muestran imágenes representativas.

40 (B) muestra infiltración renal de células de macrófagos por tinción inmunohistoquímica F4/80 de secciones de riñón. Se muestran imágenes representativas.

(C) muestra una comparación cuantitativa entre los grupos de tratamiento determinados por las intensidades medias de las células positivas para F4/80.

45 La figura 9 muestra la efectividad de CR-EA, dLGG y simvastatina (simva) en el uso para reducir la expresión de proteínas involucradas en la inducción de hipoxia y la producción de mediadores lipídicos relacionados con inflamación y sepsis, en donde:

50 (A) muestra la expresión creciente del factor inducible por hipoxia -1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) atenuado por los tratamientos con CR-EA, dLGG y simvastatina. Se muestran imágenes representativas.

(B) demostró que la expresión de PPAR- $\delta$  disminuyó mediante los tratamientos con CR-EA, dLGG y simvastatina. Se muestran imágenes representativas.

55 (C) y (D) muestran comparaciones cuantitativas entre los grupos de tratamiento determinados por las intensidades medias de los niveles de expresión de HIF-1 $\alpha$  y PPAR- $\delta$ , respectivamente.

La figura 10 muestra el efecto de despigmentación de CR-EA o compuesto único aislado de dLGG de *Crassocephalum rabens*, en donde:

60 (A) muestra las fotografías de PELLAS de células de melanoma B16 después de 72 h de tratamiento con 50  $\mu$ g/ml de ácido kójico (KA) o fracciones EA derivadas de extractos totales de agua hirviendo (CR-W-EA) o extractos etanólicos totales (CR- Et-EA) a 25  $\mu$ g/ml o 50  $\mu$ g/ml.

65 (B) muestra la despigmentación en células de melanoma B16 por dLGG de 45  $\mu$ M en diferentes puntos de tiempo.

(C) muestra el análisis de transferencia Western de la expresión de la proteína MITF asociada a melanogénesis y la tirosinasa con el tratamiento con vehículo (grupo de control) o dLGG de 45  $\mu\text{M}$ .

#### Descripción detallada de la invención

5 El término "cantidad efectiva, cantidad efectiva para prevenir y/o tratar" significa la cantidad (porcentaje en peso de la composición) del ingrediente bioactivo (extracto o compuesto) para generar un efecto específico, prevenir y/o tratar el efecto. El experto en la técnica relacionado con esta presente invención debería comprender que la cantidad efectiva puede ser diferente debido a razones tales como tratar de alcanzar un efecto específico, para prevenir y/o tratar el tipo de enfermedades y la forma de administrar fármacos. Por lo general, la cantidad del ingrediente bioactivo en el compuesto puede ser de aproximadamente 1% a aproximadamente 100% del peso de la composición, mejor es aproximadamente 30% a 100%.

15 El término "vehículo médico, saludable o aceptable para alimentos" incluye cualquier vehículo médico, saludable o alimentario aceptable estándar. El vehículo que puede ser sólido o líquido depende de la forma de la composición farmacéutica, nutricional adictiva o saludable. Ejemplos del vehículo sólido incluyen lactosa, sacarosa, gelatina y agar. Ejemplos del vehículo líquido incluyen solución salina normal, solución salina regulada, agua, glicerol y metanol.

20 El término "objeto purificado" significa un producto purificado de cualquier proceso de purificación de una fuente o un producto crudo (por ejemplo, el extracto de la planta en esta presente invención).

La realización de esta presente invención se describe adicionalmente con los siguientes ejemplos. Los propósitos, características y ventajas de esta presente invención serán más claros debido a la siguiente descripción y figuras.

#### 25 1. Materiales y métodos.

##### 1.1 Reactivos y anticuerpos

30 D-galactosamina N (D-GalN), lipopolisacárido (LPS), silimarina, simvastatina, ácido kójico (KA) y dimetilsulfóxido (DMSO) se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Se utilizaron marcadores de proteínas preteñidas (Bioman, Taipei, Taiwán) para estimar los marcadores de peso molecular de SDS-PAGE. El ejemplo de esta presente invención también usó los anticuerpos primarios contra tirosinasa, factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) (Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpo F4/80 (eBioscience). Los ratones recombinantes TNT- $\alpha$  y el kit ELISA para medir TNT- $\alpha$  e IL-6 eran de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). Se utilizaron kits comerciales adquiridos de Randox Laboratories (Reino Unido) para probar la actividad de la aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT). Todos los demás productos químicos y solventes fueron de grado reactivo o de cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

##### 40 1.2 Cultivo celular

La línea celular de melanoma B16 se obtuvo de ATCC (Manassas, VA) y se cultivó en medio RPMI 1640 (Gibco/BRL) suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10%, penicilina 100 unidades/ml y estreptomina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , a 37  $^{\circ}\text{C}$  en una incubadora humidificada con 5% de  $\text{CO}_2$ .

##### 45 1.3 Ensayo de despigmentación

50 La línea celular de melanoma B16 se colocó en platos de cultivo de 10 cm a una densidad inicial de  $1 \times 10^5$  células plato $^{-1}$  y luego se cultivó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Después de 12 horas de siembra, las células fueron tratadas con vehículo DMSO, ácido kójico (KA), fracciones de acetato de etilo (EA) del agua de CR y extracciones etanólicas (Hou et al., 2007) durante 72 horas. Estas células se recolectaron por centrifugadora y evaluaron visualmente el color de estas pellas celulares. En otro experimento, se observó el efecto de despigmentación del compuesto único dLGG y se evaluó en diferentes momentos con el mismo procedimiento.

##### 55 1.4 Animales

El ratón hembra C57BL/6J o el ratón hembra ICR (de 4 semanas de edad) fueron suministrados por el National Laboratory Animal center (Taipei, Taipei, Taiwán) y recibieron una dieta de laboratorio estándar y agua destilada *ad libitum* y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. a  $22 \pm 2$   $^{\circ}\text{C}$ . La realización en esta presente invención se realizó siguiendo las pautas institucionales y aprobada por el Institutional Animal Care and Utilization Committee of Academia Sinica, Taiwán.

##### 60 1.5 Extractos de plantas y preparación de dLGG

65 La preparación de extractos de CR, MB y GD siguió el protocolo previamente publicado por Hou et al. (Hou et al., Cancer Research 67, 6907-6915, 2007) con algunas modificaciones. Se extrajeron aproximadamente 15 kg de planta entera fresca en 2-3 veces en peso de etanol al 95% a temperatura ambiente. Se usó acetato de etilo para someter a partición los extractos etanólicos totales para producir la fracción de acetato de etilo (EA) (GD: 8.6 kg; MB: 8.9 kg).

Adicionalmente, se usó diclorometano-metanol para eluir una columna de gel de sílice para separar la fracción EA de GD y MB para producir 10 subfracciones respectivamente, en donde la relación de elución de metanol a diclorometano para GD fue 1:9, para MB fue 1:12 y para CR fue 1:9. Para GD, la subfracción 7 (817 g) se purificó adicionalmente usando una columna de gel Diaion HP-20 eluida con etanol al 95% para dar una fracción enriquecida con monogalactosildiacilgliceroles (designada GDE; 253.3 g). Para MB, la subfracción 6 (1.06 kg) se purificó adicionalmente usando una columna de gel Diaion HP-20 eluida con etanol al 95% para dar una fracción enriquecida con monogalactosildiacilgliceroles (designada MBE; 360.1 g).

Se usó RP-HPLC/APCI-M para determinar la huella química de las fracciones enriquecidas. La caracterización del compuesto se realizó utilizando resonancia magnética nuclear (RMN)  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  junto con APCI/MS, utilizando un espectrómetro de RMN AVV 500 AV de Bruker y un espectrómetro de masas Thermo Finnigan/LCQ Advantage funcionando en modo de iones positivos, respectivamente.

Y luego, la HPLC en fase reversa se realizó bajo la siguiente columna y en condiciones de tener una fracción CR-EA y un espectro químico de la misma. La columna era una columna semi-preparativa (Phenomenex 5  $\mu\text{m}$ , C18, 250  $\times$  4.6 mm) y la condición era llevar a cabo la elución isocrática con etanol al 98%, velocidad de flujo de 1 ml/min. Los dLGG mostrados en los espectros de HPLC se tomaron como un compuesto indicado de fracciones de EA bioactivas.

El espectro HPLC de GDE o MBE podría realizarse a través del mismo protocolo para tratar fracciones enriquecidas con galactolípidos de GDE o MBE (eluyéndolo con metanol-diclorometano, en donde la relación de etanol a diclorometano fue de aproximadamente 9:1 a 8:2).

1.6 Efectos de protección de dLGG o extractos de plantas que contienen dLGG sobre la hepatitis fulminante aguda en ratones inducida por LPS/D-GalN

Se investigó el efecto hepatoprotector en el cuerpo vivo del compuesto dLGG aislado de *Crassocephalum rabens* (Asteraceae) en hepatitis fulminante inducida por LPS/D-GalN y se comparó con el fármaco hepatoprotector, silimarina (SM). Los ratones se separaron al azar en cuatro grupos (n = 6 por grupo) para los tratamientos: vehículo; LPS/D-GalN; 50 mg/kg de silimarina (Post-SM50); y 10 mg/kg de dLGG (post-dLGG10), y todos los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal. Una hora después de que los ratones tratados con 500 ng de LPS y 250  $\mu\text{L}$  de solución salina que contenía 25 mg de D-GalN (Huang et al., 2012), se administraron dLGG y silimarina por vía intraperitoneal. Además, los otros dos grupos de ratones fueron tratados con dLGG o silimarina continuamente durante tres días para realizar el efecto de protección de dLGG contra la hepatitis fulminante inducida por LPS/D-GalN. Ocho horas después de la inyección de LPS/D-GalN, se recolectaron muestras de sangre mediante sangrado retroorbital, y luego se sacrificaron todos los ratones para recolectar muestras de sangre y tejidos hepáticos.

1.7 Protección o efecto del tratamiento de dLGG o extracto de planta que contiene dLGG sobre la sepsis en ratones t inducidos por LPS

El efecto terapéutico de dLGG o dLGG que contiene extractos de CR se estimó induciendo inflamación aguda y choque séptico usando LPS, y la simvastatina (Simva) se usó como grupo de control positivo. Los ratones se separaron al azar en diferentes grupos de tratamiento: vehículo, 10 mg/kg de LPS, 10 mg/kg de simvastatina (Simva 10), 10 mg/kg de extracción CR-EA (CR-EA 10), 50 mg/kg de extracto de CR-EA (CR-EA 50), 5 mg/kg de dLGG (dLGG 5) y 25 mg/kg de dLGG (dLGG 25). Los componentes de la planta o los fármacos fueron inyectados una hora antes de la administración de LPS. Otro grupo de animales solo se trató con 25 mg/kg de dLGG (solo dLGG 25). Todos los grupos se sacrificaron después de 24 horas y se recolectaron muestras de sangre mediante sangrado retroorbital antes de la escarificación de ratones y los tejidos de órganos se recolectaron inmediatamente.

1.8 Método de histología e inmunohistoquímica

Los tejidos de hígado, pulmón y riñón se fijaron en formalina regulada al 10% y luego se embebieron en parafina. Los tejidos embebidos en parafina se cortaron en rodajas (8  $\mu\text{m}$ ) y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Además, secciones de hígado y pulmón embebidos en parafina (4  $\mu\text{m}$  de espesor) se inmovilizaron por calor y se desparafinaron mediante el uso de xileno y se rehidrataron en una serie graduada de etanol con un lavado final en agua destilada, y finalmente se empaparon en la cámara de desbloqueo (Biocare Medical) que contiene la Solución de Recuperación de Objetivo (DakoCytomation) para la recuperación de antígeno.

La detección in situ de células apoptóticas se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante (Chemicon). Está utilizando la desoxinucleotidil transferasa terminal para trabajar en la secuencia de nucleótidos para formar una muesca en la posición dUTP para el etiquetado del extremo de la muesca dUTP mediada por la desoxinucleotidil transferasa terminal. Finalmente, se utilizó el software AxioVision (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) para analizar el número de células positivas en TUNEL.

La inmunohistoquímica con tejidos de hígado, pulmón y riñón se realizó incubando las muestras en el anticuerpo primario F4/80 durante la noche, respectivamente. Después del lavado subsecuente, cada una de las muestras se incubó usando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. El software AxioVision (Carl Zeiss MicroImaging,

Inc.) capturó imágenes fluorescentes de la infiltración de células de macrófagos (célula teñida con F4/80 positiva) y luego las analizó.

### 1.9 Transferencia Western

El tejido hepático (0.1 g) de cada ratón se estimó por homogeneización en un molino mezclador de bolas (MM301, Retsch, Haan, Alemania) durante 2 minutos, se extrajo agregando 0.4 ml de regulador de lisis y se centrifugó a 15,000xg durante 30 minutos a 4 °C (Shyur et al., 2008). Se recolectó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteína total de la muestra mediante el kit de prueba de proteína DC (Bio-rad). La proteína se resolvió mediante SDS-PAGE con gradiente de 5% ~ 20% y luego se transfirió a la membrana y se inmunotransfirió con reactivos de quimioluminiscencia mejorados (ECL, Amersham) y anticuerpos monoclonales contra proteínas específicas.

Las proteínas celulares se produjeron de acuerdo con el método publicado previamente (Chiang et al., 2005). El contenido de proteína se midió mediante el método de Bradford (Bio-Rad).

### 1.10 Medición de la actividad sérica de AST y ALT

Las muestras de sangre de los ratones analizados se centrifugaron bajo 4 °C, 1400 × g durante 15 minutos para separar el suero de la sangre. Se usó un kit comercial adquirido de Randox Laboratories (Reino Unido) para determinar la actividad de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) en sobrenadantes de suero.

### 1.11 Medición de suero IL-6 y TNF-α

Los niveles séricos de interleucina (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) se determinaron utilizando un kit comercial de eBioscience.

### 1.12 Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como medias ± error estándar de la media (SEM). Las diferencias fueron comparadas por ANOVA. Diferentes superíndices de letras indican diferencias significativas dentro de los tratamientos; P <0.05 se consideró estadísticamente significativo.

## 2. Resultados

### 2.1 Huellas químicas para tres plantas alimenticias o farmacéuticas de *Gynura divaricata* subsp. *formosana* (Asteraceae) y *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) (Commelinaceae)

Se usaron RP-HPLC y espectrometría de masas por ionización química atmosférica (ACPI-MS) para establecer las huellas químicas de la fracción bioactiva GDE y MBE. Se identificaron todos los constituyentes de monogalactosildiacylglicerol presentes en las fracciones enriquecidas con galactolípidos de GDE y MBE. Como se muestra en la figura 1 y la tabla 1, se identificó 1,2, di-O-α-linolenil-3-O-β-galactopiranosil-sn-glicerol (dLGG) como el componente principal de CD. Como se muestra en la figura 2 y la tabla 2, se identificó dLGG como el componente principal de MB. La huella química de CR-EA, que se muestra en la figura 3, fue tomada por RP-HPLC, en donde dLGG fue el compuesto de indicación en la fracción de EA bioactiva (CR-EA) de CR.

La figura 1A y la figura 2A muestran la distribución pico de compuestos en el cromatograma de iones totales de GDE y MBE, respectivamente. Se encontraron cinco compuestos galactolípidos en GDE con las unidades estructurales de ácidos grasos identificados como 8:3/18:3 (dLGG), 18:4/18:4 (1), 18:4/18:3 (2), 18:2/18:3 (4), 16:0/18:3 (5). Mientras tanto, las unidades estructurales de ácidos grasos de los siete compuestos galactolípidos en MBE se identificaron como 8:3/18:3 (dLGG), 18:4/18:4 (1), 18:4/18:3 (2), 18:2/18:3 (4), 16:0/18:3 (5), 18:1/18:3 (6), y 16:0/18:2 (7). No se confirma que el posicionamiento sn de las dos unidades estructurales de ácidos grasos en los compuestos 2, 4, 5, 6 y 7.

La m/z del aducto de Na<sup>+</sup> [M + Na]<sup>+</sup> y los iones de fragmentos correspondientes al diacylglicerol, monoacylglicerol y unidades estructurales de ácidos grasos de ACPI-MS se tabulan en las tablas 1 y 2. Aquí, los significados de las abreviaturas en las tablas 1 y 2 son los siguientes: 18: 3, ácido α-linolénico; 18:2, ácido α-linoleico; 18:1, ácido oleico; 16:0, ácido palmítico. El porcentaje pico se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{\text{cada área pico}}{\text{areá pico de compuestos de monogalactosildiacylglicerol totales}} \times 100\%$$

Tabla 1: datos de APCI-MS de cinco compuestos principales de monogalactosil diglicéridos en fracción de GDE

iones pico	pico				
	dLGG(3)	1	2	4	5
$m/z [M + Na]^+$	797(4)	793(1)	771(6)	799(3)	738(1)
Unidades estructurales de diacilglicerol					
$[CH_2(OCOR_1)CH(OCOR_2)-CH_2OH_2]^+$	613(100)	609(100)	611(100)	615(100)	554(100)
$[CH_2(OCOR_1)CH(OCOR_2)-CH_2]^+$	595(13)	591(43)	613(13)	597(13)	536(15)
Unidades estructurales de Monoacilglicerol					
$[CH_2(OCOR_1)CH(OH)CH_2]^+$	335(3)	334(3)	335(3)	337(4)	364(11)
$[CH_2(OH)CH(OCOR_2)CH_2]^+$			337(4)	335(5)	391(3)
Unidades estructurales acilo					
$[R_1]^+$ y $[R_2]^+$	261(23)	259(30)	261(32)	263(24)	239(22)
			260(26)	261(26)	261(17)
Tiempo de residencia (min)	15.82	6.65	8.31	18.88	21.34
Especies moleculares (ácido graso / ácido graso)	18:3/18:3	18:4/18:4	16:0/18:2	18:2/18:3	16:0/18:3
% (porcentaje pico)	88.1	3.2	7.5	1.0	0.1

Tabla 2: Datos de APCI-MS de cinco compuestos principales de monogalactosil diglicéridos en fracción de MBE

iones pico	pico						
	dLGG(3)	1	2	4	5	6	7
$m/z [M + Na]^+$	797(1)	793(1)	771(5)	799(3)	775(4)	801(5)	777(10)
Unidades estructurales de diacilglicerol							
$[CH_2(OCOR_1)CH-(OCOR_2)CH_2OH_2]^+$	613 (100)	609 (100)	611 (100)	615 (100)	591 (23)	617 (100)	575 (100)
$[CH_2(OCOR_1)CH-(OCOR_2)CH_2]^+$	595 (11)	591 (14)	613 (6)	597 (9)	573 (7)	599 (30)	593 (6)
Unidades estructurales de Monoacilglicerol							
$[CH_2(OCOR_1)CH-(OH)CH_2]^+$	335(5)	334(3)	335(5)	337(3)	313(9)	339(10)	313(24)
$[CH_2(OH)CH-(OCOR_2)CH_2]^+$			337(7)	335(3)	335(4)	335(8)	337(10)

(continuación)

Iones pico	pico						
	dLGG(3)	1	2	4	5	6	7
Unidades estructurales acilo							
[R <sub>1</sub> ] <sup>+</sup> and [R <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	261 (22)	259 (24)	261 (29)	263 (21)	239 (22)	265 (10)	239 (21)
			260 (21)	261 (17)	261 (15)	261 (16)	263 (30)
Tiempo de residencia (min)	15.82	5.64	8.24	18.91	22.72	22.72	26.91
Especies moleculares (ácido graso/ ácido graso)	18:3/18:3	18:4/18:4	16:0/18:2	18:2/18:3	16:0/18:3	18:1/18:3	16:0/18:2
% (porcentaje pico)	78.9	1.9	12.2	2.2	1.2	1.2	2.4

La Figura 1B y la Figura 2B muestran las estructuras químicas de los monogalactosildiacylgliceroles en las fracciones GDE y MBE, respectivamente. El compuesto constituyente principal y activo es dLGG con las fracciones enriquecidas que contienen 88.1% (*G. divaricata* Subsp. *Formosana*) y 78.9% (*M. bracteata*). Y dLGG se determinó como 65.7% en la fracción bioactiva de *C. rabens* (Hou et al., 2007). Con dLGG como un compuesto indicador de la fracción enriquecida con galactolípidos extraída de las tres plantas farmacéuticas en esta presente invención, el método de perfil de huellas química desarrollado puede usarse para asegurar la consistencia de las preparaciones de las fracciones bioactivas lote por lote y puede ser el protocolo para el aseguramiento regular de la calidad.

## 2.2 dLGG como agente terapéutico para la hepatitis fulminante aguda de ratones inducidos por LPS/D-GalN

La insuficiencia hepática fulminante (FHF), sinónimo de insuficiencia hepática aguda, está relacionada con trastornos hepáticos graves que dan como resultado una distorsión rápida de la función hepática que a menudo conduce a consecuencias devastadoras (Sass and Shakil, 2005). Es una enfermedad que amenaza la vida, con el trasplante ortotópico de hígado como el único tratamiento curativo en la actualidad (Russo and Parola, 2011).

Los ratones inducidos por LPS/D-GalN para causar hepatitis fulminante aguda pueden ser un modelo animal ampliamente utilizado para imitar los eventos en cascada de FHF observados en la clínica (Kosai et al, 1999). Esta presente invención utiliza este modelo para evaluar el efecto terapéutico de dLGG, un compuesto bioactivo aislado de MB, CR y GD, y las fracciones de galactolípidos enriquecidas con dLGG GDE y MBE en la lesión hepática.

Al mismo tiempo, se usó un fármaco hepatoprotector comercial, la silimarina (SM), como control de referencia. Los ratones recibieron LPS/D-GalN 1 hora antes de la inyección intraperitoneal del control del vehículo DMSO al 0.5%, dLGG (10 mg/kg) y SM (50 mg/kg). Se recolectaron sueros de sangre de ratones de diferentes grupos para medir los dos indicadores clínicos de daño o disfunción hepática, las actividades de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT).

La Figura 4 y la Figura 5 muestran el resultado de la evaluación de la actividad de la fracción enriquecida con galactolípidos de GDE y MBE, y un compuesto puro de dLGG. De acuerdo con la figura 4A, muestra que GDE, MBE y el fármaco hepatoprotector SM pueden reducir efectivamente el aumento doble de los niveles séricos de ALT en ratones expuestos a LPS/D-GalN en comparación con el grupo de control.

Como se muestra en la Figura 4B, el examen de histopatología por tinción con H&E mostró que la infiltración observada de células inflamatorias en los lóbulos hepáticos, la destrucción del tejido y el influjo de eritrocitos en el tejido hepático, etc. en ratones expuestos a LPS/D-GalN disminuyó significativamente en los grupos tratados.

Como se muestra en la Figura 5, muestra que el tratamiento con dLGG después de la inducción de hepatitis fulminante puede inhibir significativamente el aumento de los niveles de AST y ALT en suero inducidos por LPS/D-GalN en ratones, como lo hizo SM. Adicionalmente, la Figura 5 muestra que el hígado de ratones expuestos a LPS/D-GalN exhibió infiltración de células inflamatorias en los lóbulos hepáticos, destrucción de tejidos e influjo de eritrocitos en comparación con el control del vehículo, y que fue atenuado tanto por el tratamiento con dLGG como con SM. Además, el tratamiento con dLGG también disminuyó significativamente el número de células de apoptosis, células con tinción positivas en TUNEL, en tejido hepático de ratones.

Además, dLGG todavía tiene un efecto de protección significativo en ratones pretratados con dLGG (1 o 10 mg/kg) 1 hora antes de la exposición a LPS/D-GalN (datos no mostrados). Estos resultados indican que dLGG tiene un efecto terapéutico y protector contra la insuficiencia hepática fulminante inducida por LPS/D-GalN.

2.3 Efecto protector y terapéutico del extracto de *C. rabens* enriquecido con galactolípidos y dLGG contra la inflamación y la sepsis inducidas por LPS en ratones

5 La inflamación aguda causará una respuesta sistémica grave, incluida la sepsis. La sepsis es una indicación complicada que causa insuficiencia orgánica rápida y muerte. La lesión renal aguda (AKI) es una enfermedad común que amenaza la vida que tiene aproximadamente un 45% de mortalidad en los últimos treinta años, y aproximadamente la mitad de los pacientes con IKA grave se desencadena por sepsis (Uchino et al., 2005; Yasuda et al., 2006).

10 La endotoxina es un componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas que puede inducir una reacción en cascada inflamatoria grave e implicar en la patogénesis de la sepsis. El modelo de inflamación construido por infusión/inyección de LPS se ha utilizado ampliamente para estudiar la sepsis (Doi et al., 2009). En la realización de esta presente invención, se usó LPS para inducir inflamación aguda y choque séptico para observar y evaluar el efecto protector y terapéutico de dLGG (5 y 25 mg/kg de peso) y CR-EA (10 y 50 mg/kg de peso) mediante la comparación fisiopatológica de hígado, riñón y pulmón, mediante la determinación de los niveles séricos de citoquinas inflamatorias, IL-6 y TNF- $\alpha$ , y ALT y AST, indicadores de daño hepático y hepatotoxicidad, y mediante la comparación de los niveles de expresión del factor inducible por hipoxia -1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) y el receptor activador del proliferador de peroxisomas  $\delta$  (PPAR- $\delta$ ) involucrados en la inducción de hipoxia y en la producción de mediadores de lípidos inflamatorios entre los grupos de tratamiento.

20 Una hora antes de la administración de LPS, 0.5% de DMSO se trató al grupo control y 10 mg/kg de simvastatina, dLGG y CR-EA se trataron al grupo de control positivo. La simvastatina, un fármaco clínico, es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa y tiene un efecto clínicamente beneficioso sobre las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y renales agudas y crónicas (Epstein et al., 2005; Nissen et al., 2005; Almog, et al., 2004 ) La terapia con estatinas (la estatina es una categoría del fármaco inhibidor de la HMG-CoA reductasa, en donde la simvastatina es una de las categorías) tiene efecto para prevenir la sepsis y la lesión renal aguda inducida por sepsis de humanos y animales (Yasuda et al., 2006). Además, un grupo de ratones se trató con dLGG (25 mg/kg) sin exposición a LPS. Todos los ratones fueron sacrificados después de 24 horas. Se recolectaron sueros de ratones para medir y comparar la concentración de IL-6 y TNF- $\alpha$ , y los niveles de AST y ALT.

30 La Figura 6A, la Figura 6B, la Figura 7A y la Figura 7B muestran que los niveles de citoquinas de estimulación inflamatoria en suero disminuyen significativamente en los grupos de ratones tratados con CR-EA y dLGG a dosis altas, respectivamente, y luego por exposición a LPS, en donde después de ser tratados con CR-EA y dLGG, IL-6 disminuye significativamente 2.6 y 3.5 veces respectivamente, TNF- $\alpha$  disminuye 2.0 y 3.0 veces respectivamente, ALT disminuye 1.75 y 2.3 veces respectivamente, y AST disminuye 1.3 y 1.8 veces respectivamente.

35 Como se muestra en las figuras 7C, la comparación histológica de la tinción de H&E entre los diferentes grupos tratados revela que las células inflamatorias o la infiltración de glóbulos rojos en el hígado de los ratones fue inducida por exposición a LPS. La figura 8A muestra el efecto de pretratados con CR-EA y dLGG para prevenir la lesión renal aguda. El resultado de la tinción de H&E puede observarse daño de la corteza adrenal, degeneración vacuolar de células tubulares e infiltración de macrófagos. Se ha informado que la simvastatina puede mejorar el daño renal agudo inducido por la sepsis y la mortalidad usando la ligadura cecal y la operación de punción en ratones (Yasuda et al., 2006). La realización de esta presente invención, se puede observar en la Figura 5A que la simvastatina puede prevenir la lesión renal aguda inducida por sepsis de los ratones tratados con LPS, y se puede observar el mismo efecto notablemente protector en el grupo tratado con CR-EA o dLGG. Se puede concluir que estos efectos a partir de la histología renal del grupo tratado con CR-EA o dLGG es similar a los de los ratones del grupo de control del vehículo. Los resultados de tinción de inmunohistología F4/80 muestran que el tratamiento con CR-EA o dLGG resultó en una disminución de la infiltración y activación de macrófagos en el hígado, como se muestra en la Figura 8C, en comparación con el grupo de control del vehículo. El grupo de control positivo (Simva 10) muestra un resultado similar en comparación con el grupo tratado con CR-EA o dLGG. Adicionalmente, después de la exposición a LPS, el tratamiento de dLGG a una dosis de 25 mg/kg puede reducir efectivamente los daños en el hígado, pulmón y riñón de ratones causados por LPS (datos no mostrados).

50 La figura 9 demostró además que el pretratamiento de CR-EA y dLGG subregulará la expresión de dos proteínas principales, PPAR- $\delta$  y HIF-1 $\alpha$ , que implican la formación de mediadores inflamatorios y la inducción de hipoxia. Estos resultados implican que el tratamiento con CR-EA y dLGG puede atenuar el daño orgánico causado por la privación de oxígeno y las condiciones de hipoxia y puede contribuir a la regulación de los mediadores de lípidos inflamatorios en los niveles homeostáticos.

60 De acuerdo con las figuras 6 a 9, se muestra que los niveles de IL-6, TNF- $\alpha$ , AST y ALT en los sueros, las evaluaciones patológicas en los tejidos de órganos, tales como el hígado y los riñones, y los niveles de expresión de varios marcadores de proteínas de ratones tratados solo con dLGG fueron similares a los de los ratones tratados con vehículo, así como el resultado del análisis pulmonar (datos no mostrados). Estos resultados ilustran que dLGG es inofensivo para los ratones.

65 En conclusión, estos resultados muestran que el extracto CR y el dLGG tienen el potencial de ser agentes preventivos o terapéuticos contra la sepsis inducida por LPS.

## 2.4 Despigmentación de células B16 mediante extracto de dLGG y CR-EA

5 La piel, siendo el órgano más grande del cuerpo, siempre está bajo la influencia de factores internos y externos. La piel reacciona a esos estímulos modificando el patrón de pigmentación constitutiva. La melanina, un tipo de pigmento, es responsable del color de la piel y de prevenir el daño de la piel o la pigmentación inducida por el medio ambiente (por ejemplo UV) u otros factores (fármacos o químicos). La melanina se produce a través del proceso de melanogénesis en los melanocitos (Costin and Hearing, 2007). La enzima tirosinasa es esencial en la producción de melanina en mamíferos (Hearing and Tsukamoto, 1991). El factor de transcripción asociado a la microftalmia (MITF) involucrado en la regulación de la diferenciación, pigmentación, proliferación y supervivencia de las células melanocitarias, que también es un regulador transcripcional importante de genes que codifican enzimas o proteínas melanogénicas, como la tirosinasa, la proteína 1 y la proteína 2 relacionadas con la tirosinasa (Yasumoto et al., 1997; Hasegawa et al., 2010).

15 Se ha utilizado una célula de melanoma B16 altamente pigmentada como modelo experimental para estudiar el efecto de despigmentación de compuestos desde los años 70 hasta la fecha (Bang et al., 2013; Wrathall et al., 1973). En la realización de esta presente invención, las fracciones de EA derivadas de los extractos de agua cruda total (CR-W-EA) y etanólicos (CR-Et-EA) de *Crassocephalum rabens* se usaron para examinar su capacidad de despigmentar células B16 mediante observación directa. de las pellas celulares después del tratamiento. KA y DMSO se utilizaron como control positivo y de vehículo, respectivamente.

25 La figura 10 (A) muestra que CR-Et-EA posee un efecto dependiente de la dosis sobre la despigmentación de las células de melanoma B16 en comparación con el control del vehículo. Se evaluó adicionalmente el efecto de despigmentación en diferentes puntos de tiempo del compuesto único dLGG purificado de CR-Et-EA. La figura 10 (B) muestra que dLGG (45  $\mu$ M) tiene una despigmentación significativa de una manera dependiente del tiempo en las células de melanoma B16 en comparación con el grupo de control del vehículo.

30 El mecanismo molecular del efecto de despigmentación de dLGG se estudió adicionalmente. El ensayo de transferencia Western fue precedido para probar el efecto de dLGG sobre la tirosinasa y la expresión de MITF. Como se muestra en la Figura 10 (C), muestra que dLGG ciertamente puede inhibir la expresión de la proteína asociada a melanogénesis, MITF y tirosinasa. Los datos indican que dLGG inhibe la expresión de MITF y tirosinasa para suprimir la melanogénesis que provocó la despigmentación de las células de melanoma B16, lo que sugiere que dLGG puede usarse como un nuevo agente para blanquear la piel.

35 Debe entenderse que la descripción detallada mencionada anteriormente y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan solo a modo de ilustración.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición de aditivos farmacéuticos, saludables o nutricionales para uso en la prevención o el tratamiento de la hepatitis fulminante aguda disminuyendo los niveles séricos de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), que comprende:
- 5 un vehículo farmacéutico, saludable o alimentario aceptable, y
- una cantidad efectiva de un ingrediente bioactivo, en donde el ingrediente bioactivo es un extracto de plantas enriquecido con galactolípidos o un compuesto purificado obtenido de la purificación del extracto de plantas enriquecido con galactolípidos, en donde el extracto de plantas enriquecido con galactolípidos se obtiene mediante las etapas de:
- 10 (a) usar agua, metanol o etanol para extraer una muestra de plantas, en donde la muestra de plantas se selecciona de un grupo que consiste en: *Gynura divaricata* subsp. *formosana*, *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) J. K. Morton ex D. Y. Hong y *Crassocephalum rabens* S. Moore;
- 15 (b) usar acetato de etilo para someter a partición el extracto de la etapa (a) para obtener un extracto de acetato de etilo;
- 20 (c) usar un regulador de elución de alcohol para eluir una fracción enriquecida con galactolípidos del extracto de acetato de etilo de la etapa (b), en donde el alcohol es un porcentaje en volumen del 5% al 20% del regulador de elución de alcohol,
- 25 en donde la fracción enriquecida con galactolípidos es una fracción enriquecida con 1,2, di-O- $\alpha$ -linoleoil-3-O- $\beta$ -galactopiranosil-sn-glicerol (dLGG).
2. La composición para uso en la prevención o el tratamiento de la hepatitis fulminante aguda de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fracción enriquecida con galactolípidos obtenida en la etapa (c) se purifica adicionalmente mediante una cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa para tener un compuesto purificado, en donde la fracción enriquecida con galactolípidos se eluye mediante un regulador de elución de alcohol y el alcohol es un porcentaje en volumen del 70% al 100% del regulador de elución de alcohol, en donde el compuesto purificado es 1,2, di-O- $\alpha$ -linoleoil-3-O- $\beta$ - galactopiranosil-sn-glicerol (dLGG).
- 30 3. La composición para uso en la prevención o el tratamiento de la hepatitis fulminante aguda de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el regulador de elución de alcohol para uso en la etapa (c) comprende metanol y agua, metanol y diclorometano, metanol y acetonitrilo o metanol y acetona.
- 35 4. La composición para uso en la prevención o el tratamiento de la hepatitis fulminante aguda de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el regulador de elución de alcohol se usa para eluir un extracto de acetato de etilo de *Gynura divaricata* subsp. *Formosana*
- 40 5. La composición para uso en la prevención o el tratamiento de la hepatitis fulminante aguda de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el regulador de elución de alcohol se usa para eluir un extracto de acetato de etilo de *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) J. K. Morton ex D. Y. Hong.
- 45 6. Una composición de aditivos farmacéuticos, saludables o nutricionales para uso en la prevención o el tratamiento de síntomas de sepsis y daño renal agudo inducido por sepsis asociado con una mayor expresión del factor inducible por hipoxia -1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), que comprende:
- 50 un vehículo farmacéutico, saludable o alimentario aceptable, y
- una cantidad efectiva de un ingrediente bioactivo, en donde el ingrediente bioactivo es un extracto de plantas enriquecido con galactolípidos o un compuesto purificado obtenido de la purificación del extracto de plantas enriquecido con galactolípidos, en donde el extracto de plantas enriquecido con galactolípidos se obtiene mediante las etapas de:
- 55 (a) usar agua, metanol o etanol para extraer una muestra de plantas, en donde la muestra de plantas se selecciona de un grupo que consiste en: *Gynura divaricata* subsp. *formosana*, *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) J. K. Morton ex D. Y. Hong y *Crassocephalum rabens* S. Moore;
- 60 (b) usar acetato de etilo para someter a partición el extracto de la etapa (a) para obtener un extracto de acetato de etilo;

(c) usar un regulador de elución de alcohol para eluir una fracción enriquecida con galactolípidos del extracto de acetato de etilo de la etapa (b), en donde el alcohol es un porcentaje en volumen del 5% al 20% del regulador de elución de alcohol, y

5 en donde la fracción enriquecida en galactolípidos es una fracción enriquecida con 1,2, di-O- $\alpha$ -linoleoil-3-O- $\beta$ -galactopiranosil-sn-glicerol (dLGG).

7. La composición para uso en la prevención o el tratamiento de la sepsis y la lesión renal aguda inducida por sepsis de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la fracción enriquecida con galactolípidos obtenida en la etapa (c) se purifica adicionalmente mediante una cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa para tener un compuesto purificado, en donde la fracción enriquecida en galactolípidos se eluye mediante un regulador de elución de alcohol y el alcohol es un porcentaje en volumen del 70% al 100% del regulador de elución de alcohol, en donde el compuesto purificado es 1,2, di-O- $\alpha$ -linoleoil-3 -O- $\beta$ -galactopiranosil-sn-glicerol (dLGG).

8. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el regulador de elución de alcohol para uso en la etapa (c) comprende metanol y agua, metanol y diclorometano, metanol y acetonitrilo o metanol y acetona.

9. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el regulador de elución de alcohol se usa para eluir un extracto de acetato de etilo de *Gynura divaricata* subsp. *Formosana*

10. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el regulador de elución de alcohol se usa para eluir un extracto de acetato de etilo de *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) J. K. Morton ex D. Y. Hong.

11. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el síntoma relacionado es una lesión renal aguda inducida por sepsis.

12. Un uso no médico para blanquear la piel de una composición, que comprende:

un vehículo farmacéutico, saludable o alimentario aceptable, y

una cantidad efectiva de un ingrediente bioactivo, en donde el ingrediente bioactivo es un extracto de plantas enriquecido con galactolípidos o un compuesto purificado obtenido de la purificación del extracto de plantas enriquecido con galactolípidos, en donde el extracto de plantas enriquecido con galactolípidos se obtiene mediante las etapas de:

(a) usar agua, metanol o etanol para extraer una muestra de plantas, en donde la muestra de plantas se selecciona de un grupo que consiste en: *Gynura divaricata* subsp. *formosana*, *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) J. K. Morton ex D. Y. Hong y *Crassocephalum rabens* S. Moore;

(b) usar acetato de etilo para someter a partición el extracto de la etapa (a) para obtener un extracto de acetato de etilo;

(c) usar un regulador de elución de alcohol para eluir una fracción enriquecida con galactolípidos del extracto de acetato de etilo de la etapa (b), en donde el alcohol es un porcentaje en volumen del 5% al 20% del regulador de elución de alcohol, y

en donde la fracción enriquecida con galactolípidos es una fracción enriquecida con 1,2, di-O- $\alpha$ -linoleoil-3-O- $\beta$ -galactopiranosil-sn-glicerol (dLGG).

13. El uso no médico para el blanqueamiento de la piel de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la fracción enriquecida con galactolípidos obtenida en la etapa (c) se purifica adicionalmente mediante una cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa para tener un compuesto que contiene galactolípidos purificados, en donde la fracción enriquecida con galactolípidos se eluye mediante un regulador de elución de alcohol y el alcohol es un porcentaje en volumen del 70% al 100% del regulador de elución de alcohol, en donde el compuesto purificado es 1,2, di-O- $\alpha$ -linoleoil-3-O- $\beta$ - galactopiranosil-sn-glicerol (dLGG).

14. El uso no médico para el blanqueamiento de la piel de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el regulador de elución de alcohol para uso en la etapa (c) comprende: metanol y agua, metanol y diclorometano, o metanol y acetonitrilo.

15. El uso no médico para el blanqueamiento de la piel de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el regulador de elución de alcohol se usa para eluir un extracto de acetato de etilo de *Gynura divaricata* subsp. *Formosana*

16. El uso no médico para el blanqueamiento de la piel de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el regulador de elución de alcohol se usa para eluir un extracto de acetato de etilo de *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) J. K. Morton ex D. Y. Hong.

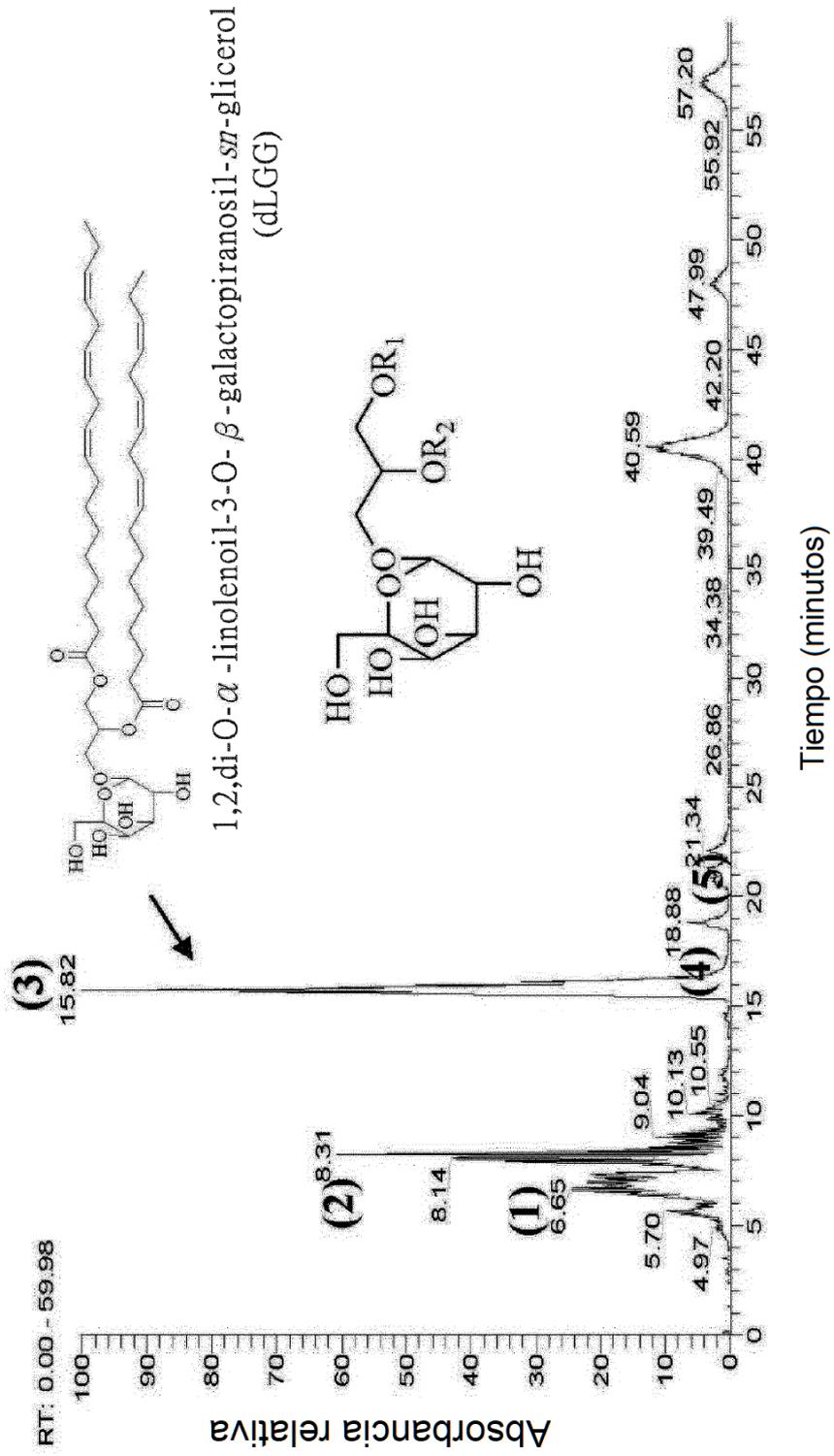


Fig. 1A

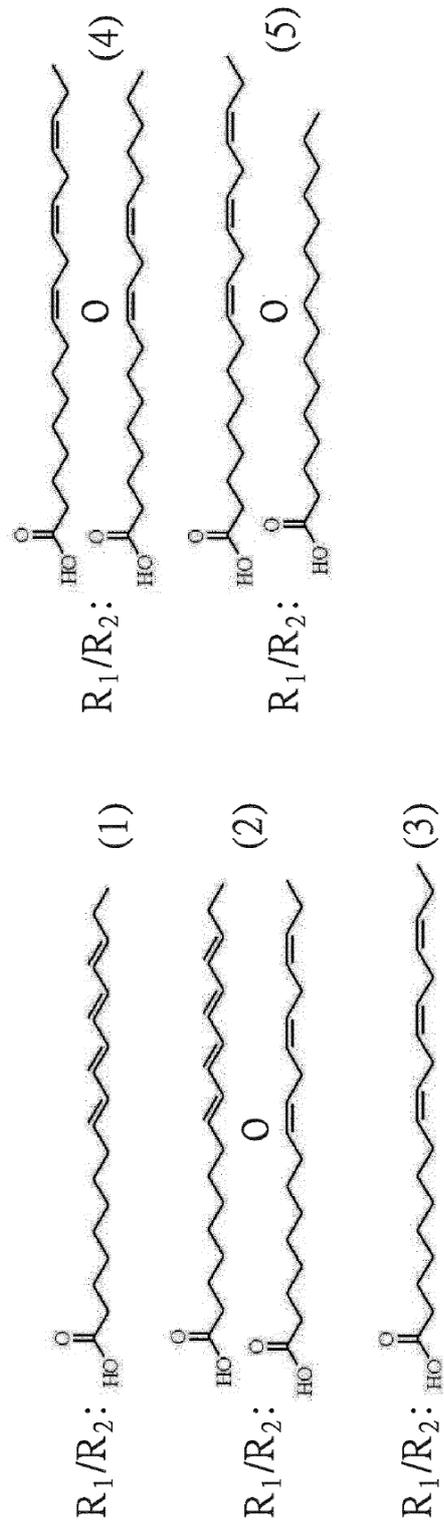


Fig. 1B

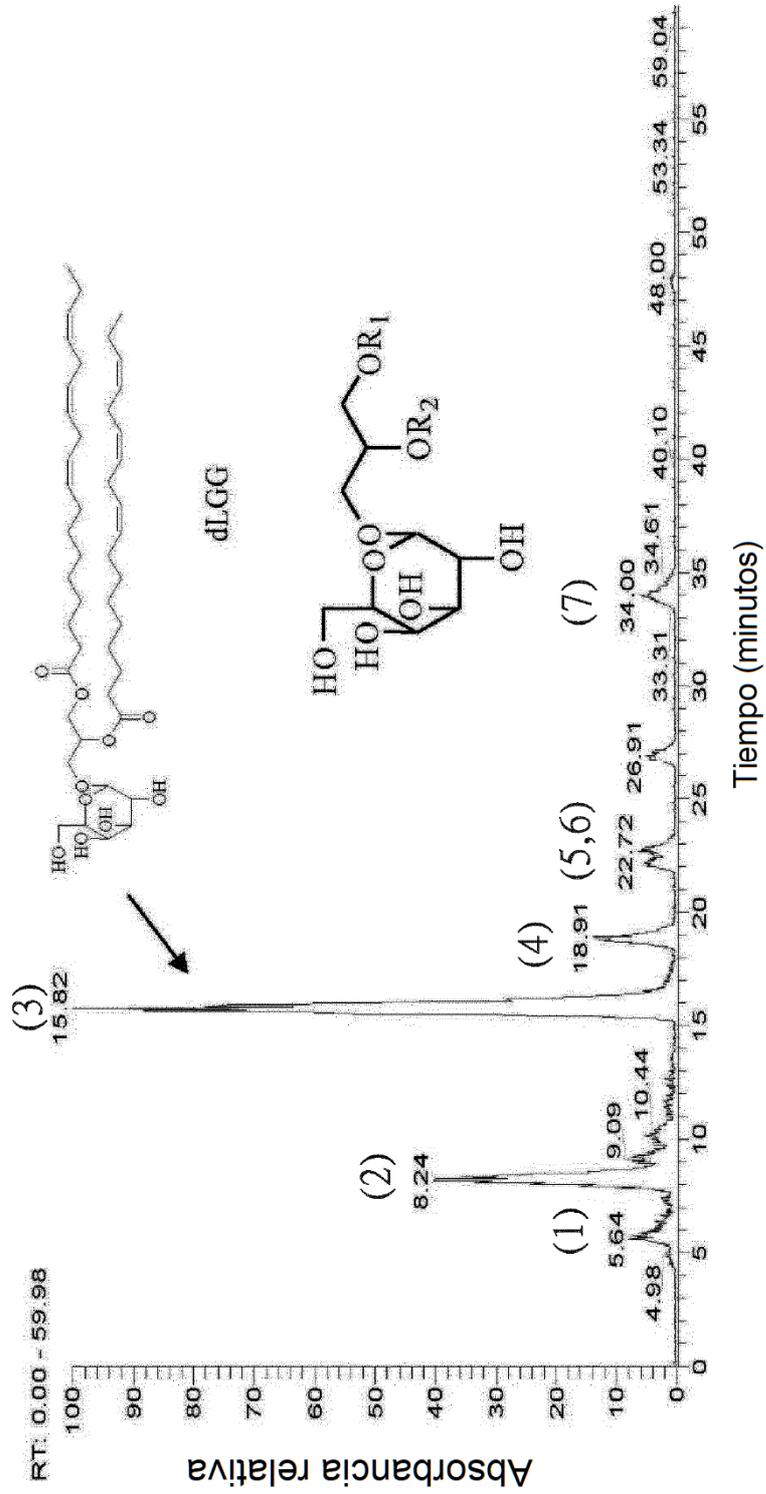


Fig. 2A

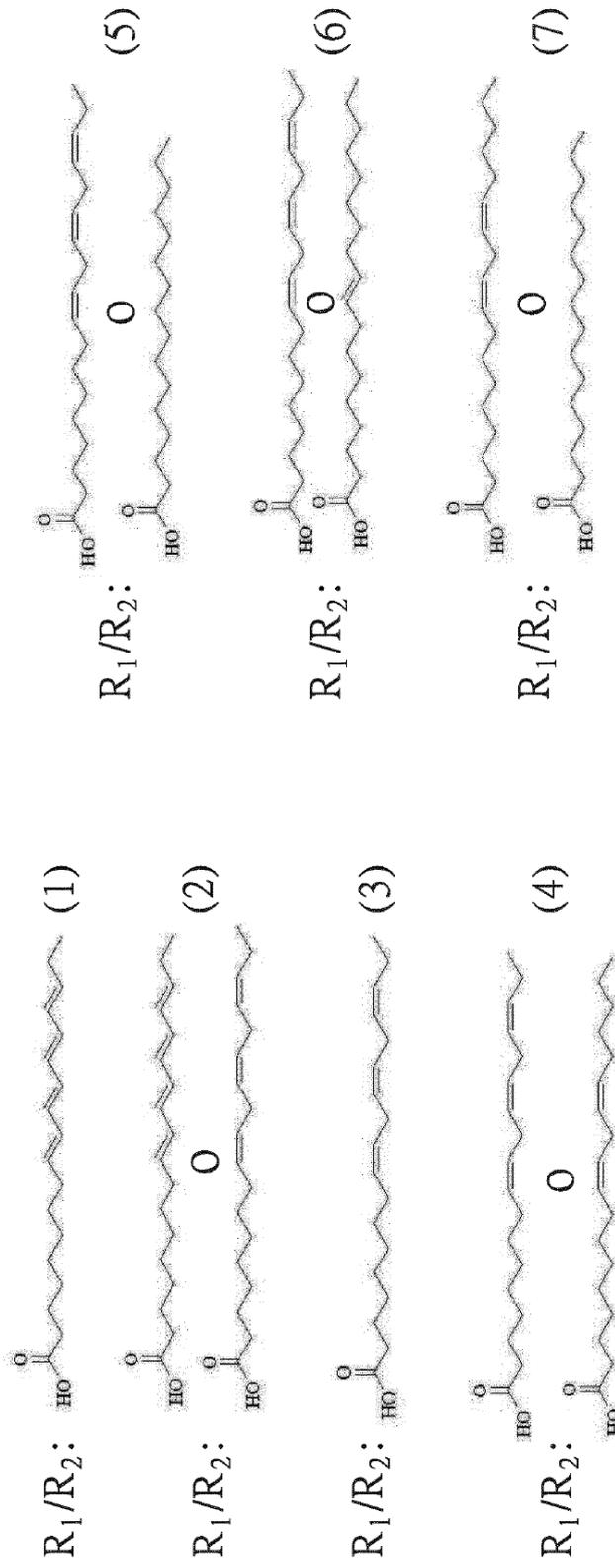


Fig. 2B

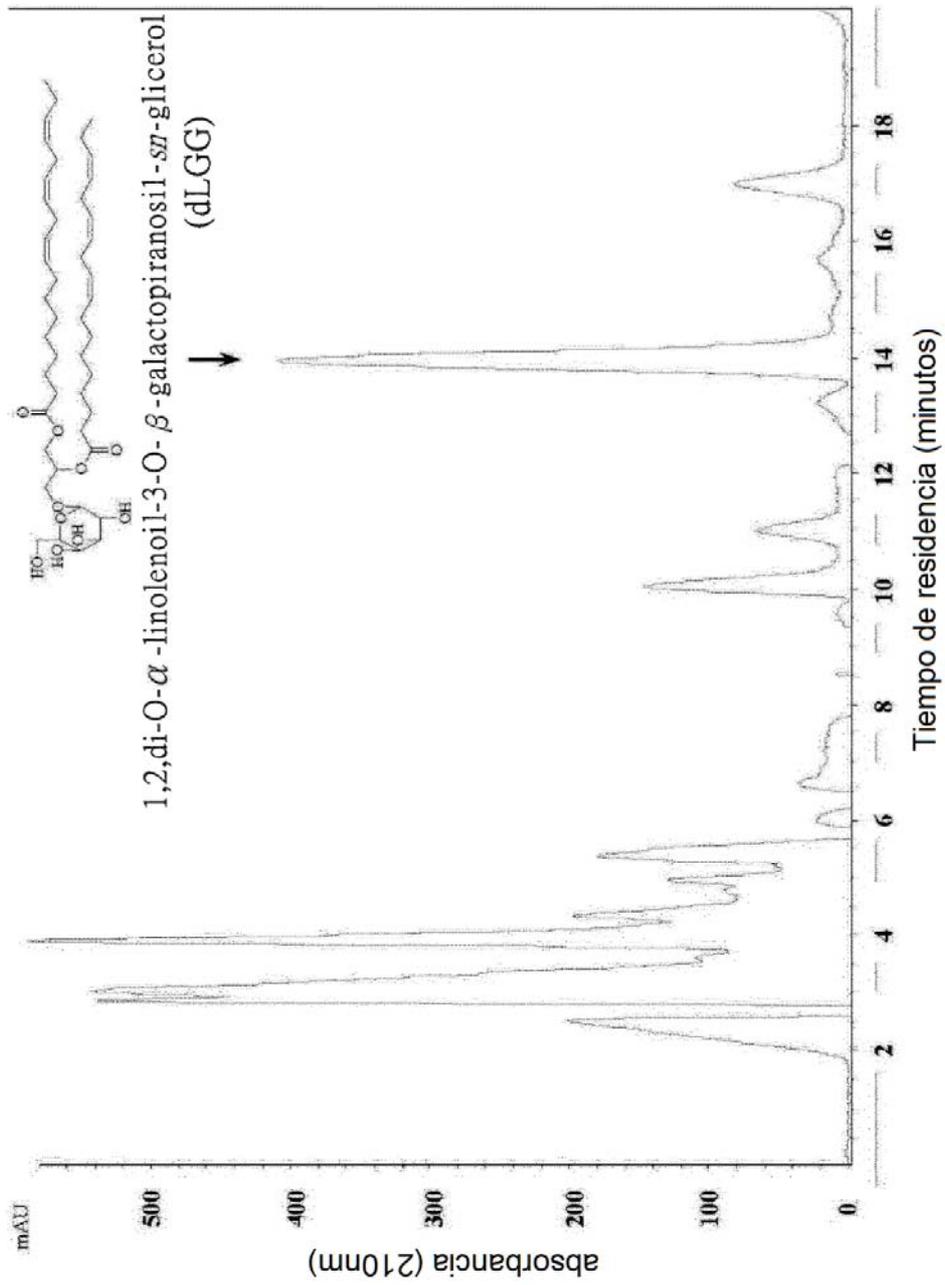


Fig. 3

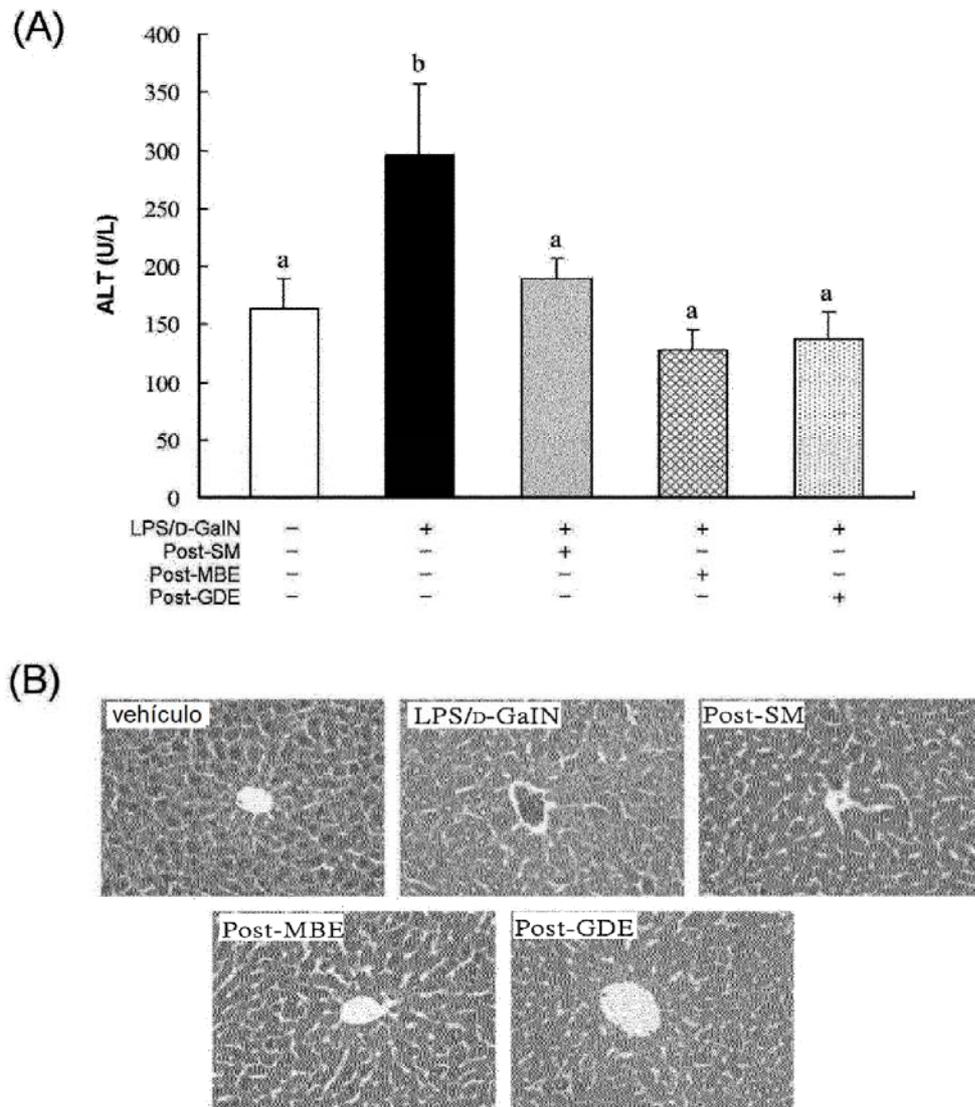


Fig. 4

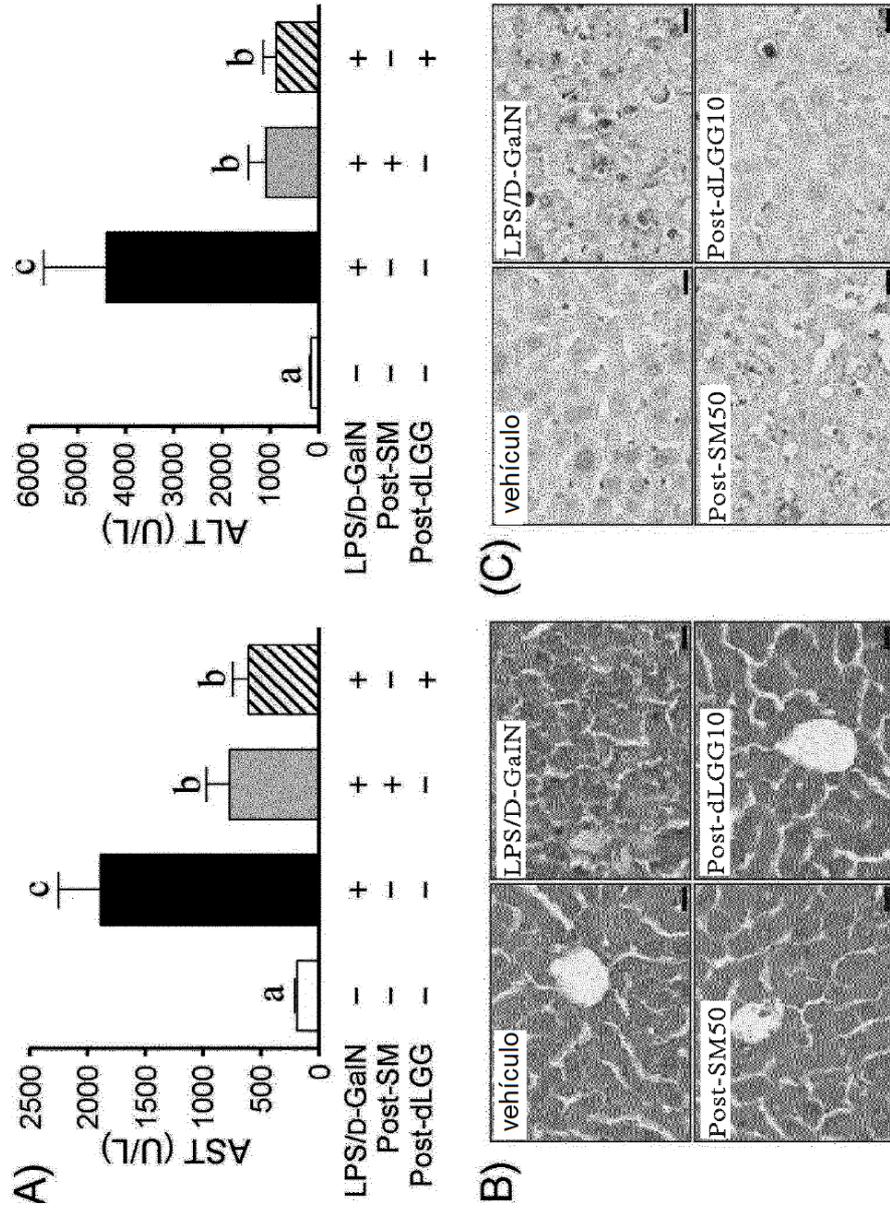


Fig. 5

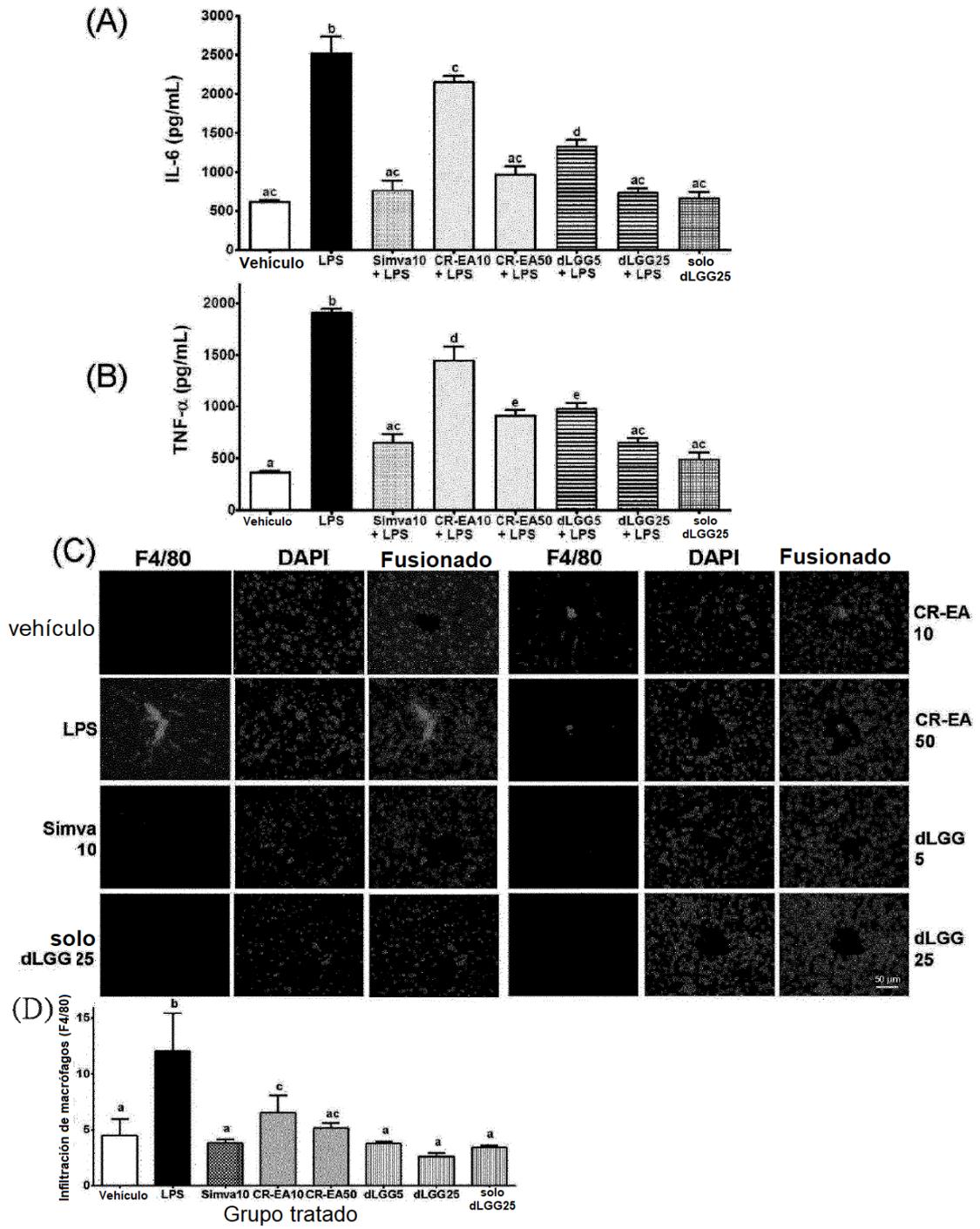


Fig. 6

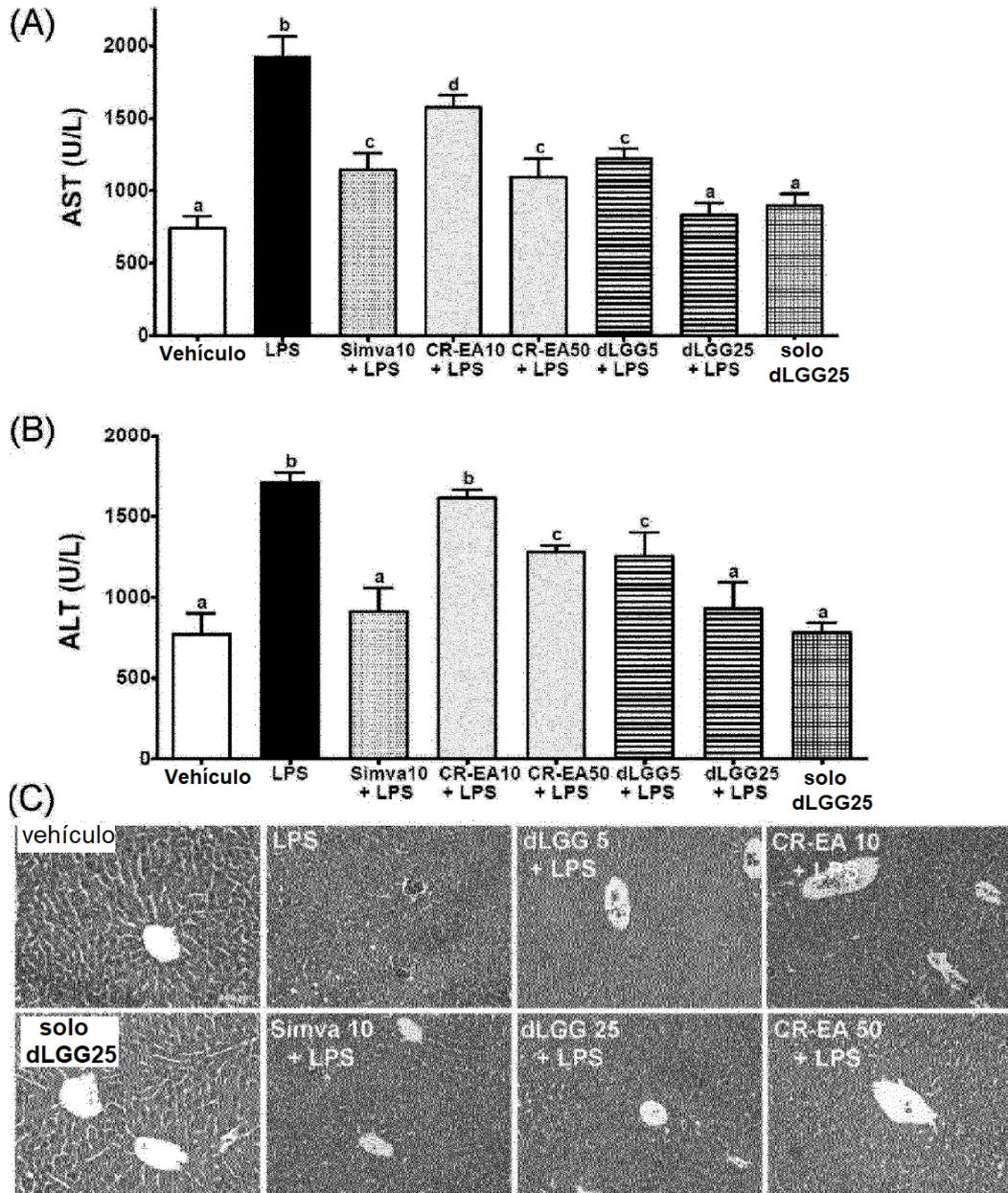


Fig. 7

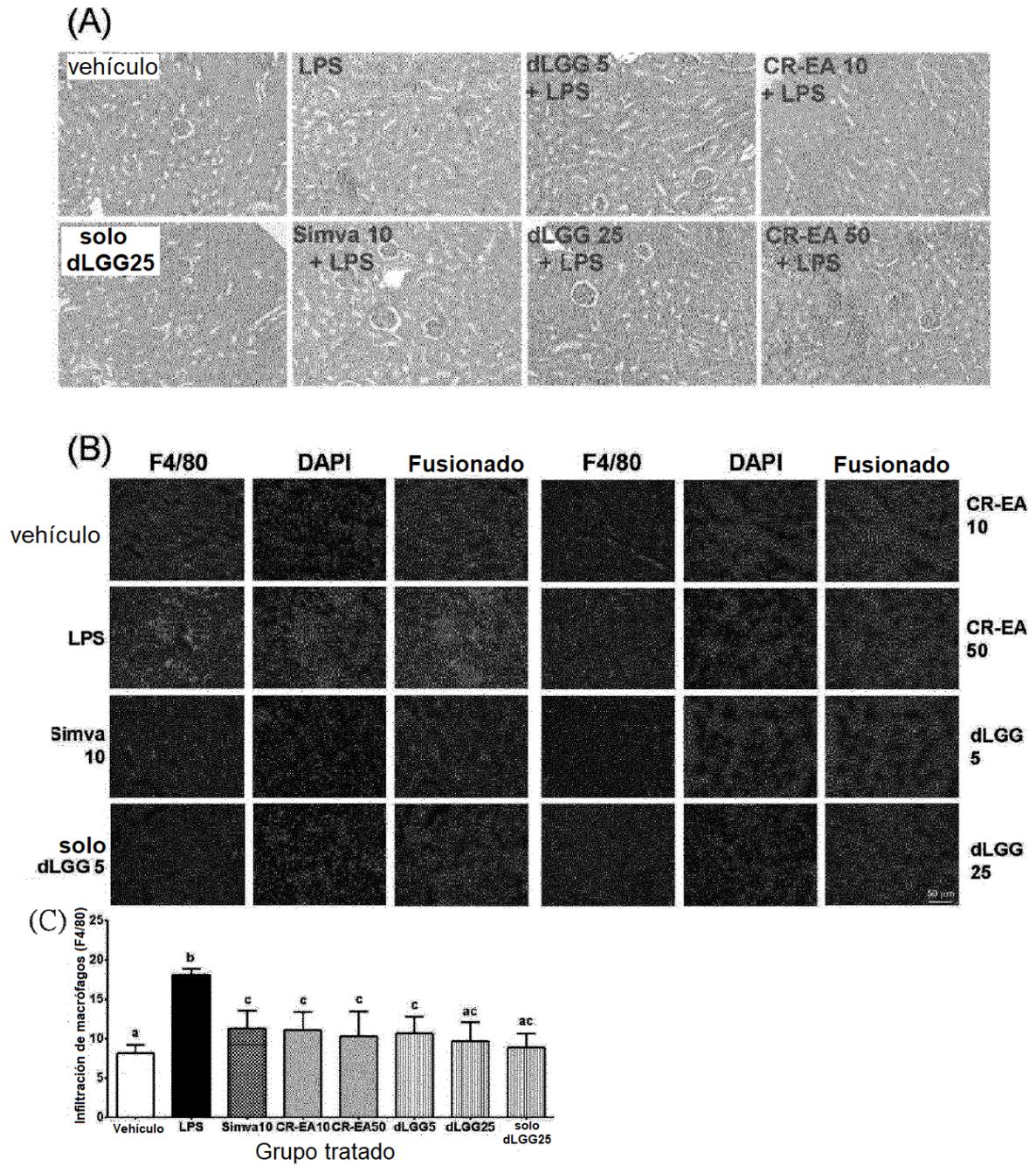


Fig. 8

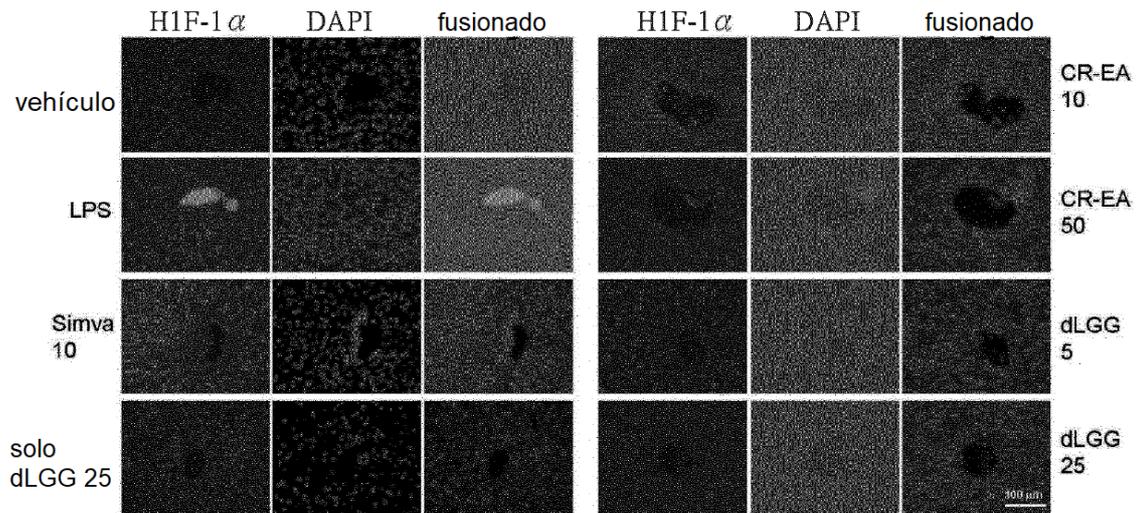


Fig. 9A

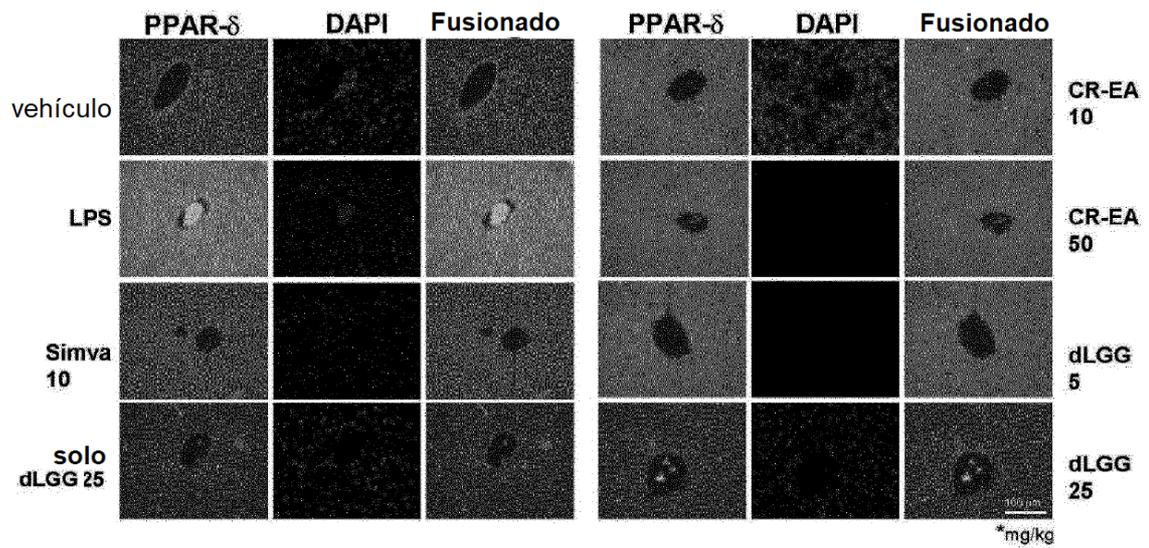


Fig. 9B

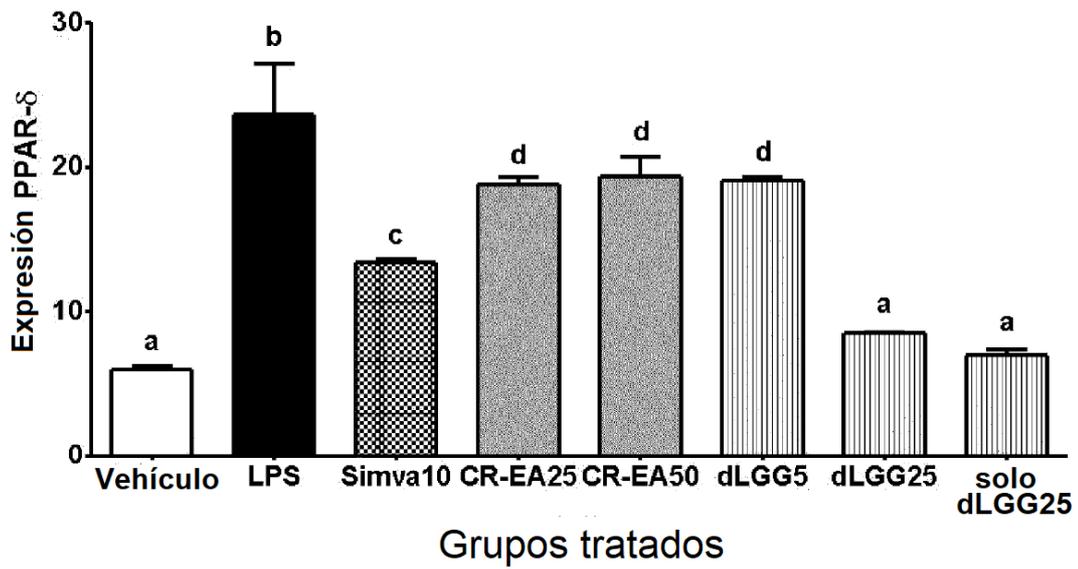


Fig. 9C

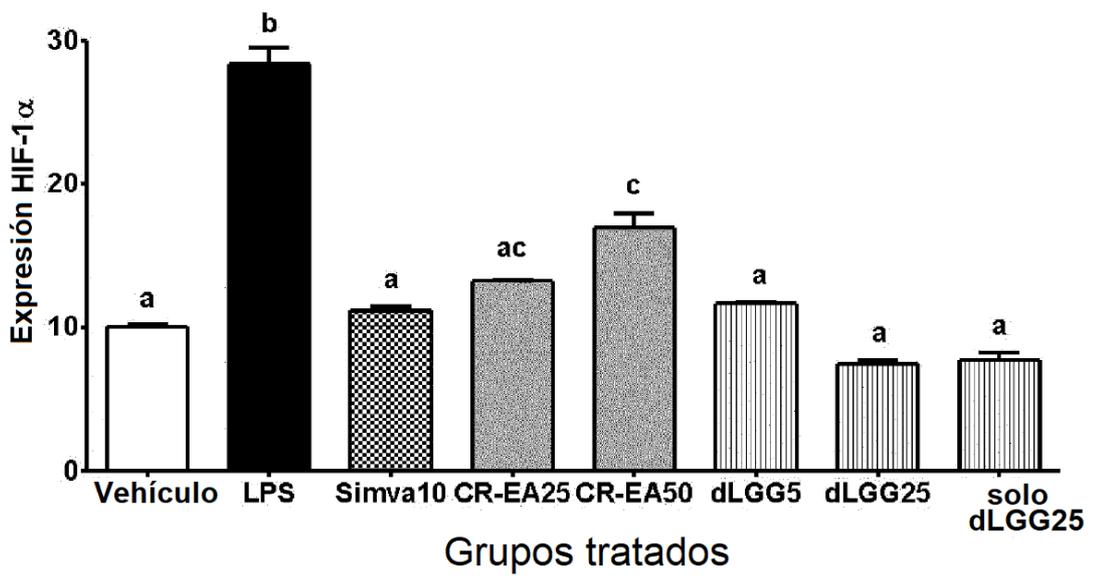


Fig. 9D

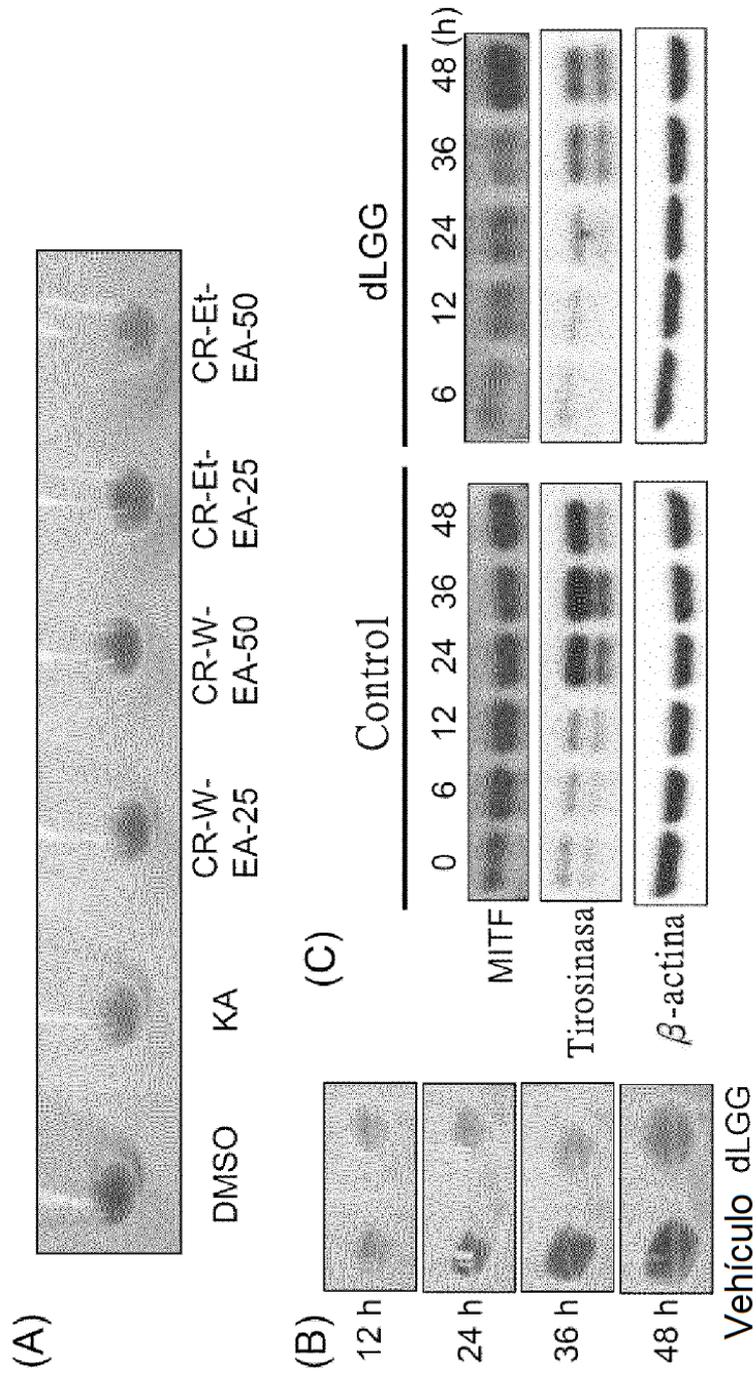


Fig. 10