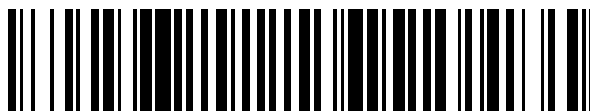


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 580**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/07** (2006.01)

**A61K 36/481** (2006.01)

**A61K 36/282** (2006.01)

**A61K 36/79** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2007 E 07851614 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 2091545**

54 Título: **Una composición que comprende el extracto de hierbas combinadas para prevenir y tratar enfermedades hepáticas**

30 Prioridad:

**20.12.2006 KR 20060130518**

**17.12.2007 KR 20070132451**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.04.2013**

73 Titular/es:

**LEE, JUNG SIK (100.0%)**  
**502-504 JUGONG APT. SANGIL-DONG**  
**GANGDONG-GU, SEOUL 134-795, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, JUNG SIK**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 400 580 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

Una composición que comprende el extracto de hierbas combinadas para prevenir y tratar enfermedades hepáticas

Campo Técnico

- 5 La presente invención se refiere a una composición que comprende extractos de hierbas de *Coriolus versicolor*, *Astragalus membranaceus* Bunge, *Schisandra chinensis* y *Artemisia capillaris*, de acuerdo a la necesidad de prevención y tratamiento de enfermedades hepáticas, y a métodos para usar la anterior composición de fármacos sin purificar y la composición farmacéutica como un agente hepato-protector.

Antecedentes de la Técnica

- 10 Los trastornos hepáticos son una de las enfermedades más frecuentes en seres humanos actuales expuestos a diversos entornos desfavorables, por ejemplo una sustancia contaminantes, una sustancia tóxica tal como beber en exceso, fumar, etc., así como a estrés psicológico, que podrían recuperarse mediante descanso, aunque pueden agravarse para dar lugar a otras enfermedades tales como el trastorno del sistema inmune. Se ha publicado que una sustancia tóxica como el tetracloruro de carbono, la D-galactosamne, etc. provocan toxicidad en el hígado y el riñón resultante de lesiones en las membranas celulares (*Brucker, J. V., Fund. Appl. Toxicology*, 6, pág. 16-34, 1986).

- 15 Hasta el momento se han presentado varios fármacos derivados de fuentes de productos naturales que actúan con la inhibición de la reproducción de radicales libres, por ejemplo, la silimarina (SLM) aislada del fruto de *Silybum marianum* (Cardo mariano) que pertenece a Compositae, BDD (Bifenil Dimetil Dicarboxilato), un análogo sintético de la esquizandrina aislada de *Schisandra chinensis*, etc. (*Caragy A. B., Food Technology*, 46, pág. 65-68, 1992; *Liang jun, Y. y col., Biochem. And Biophys. Res. Comm.*, 212, pág. 360-366, 1995).

- 20 Sin embargo, ha existido una necesidad para desarrollar fármacos efectivos y seguros para tratar y prevenir enfermedades hepáticas o para mejorar la función hepática hasta el momento.

- 25 Se ha publicado que el *Corilous versicolor*, un hongo que pertenece a las *Aphyllorphorales* distribuido por todo el mundo, comprende ergosterol, beta-sitosterol, coriolano, krestin-D-glucano y ácido telfórico y que presenta actividad antibacteriana, actividad antiinflamatoria, actividad inmune potenciada, actividad de disminución del colesterol, etc. (*Park Wan-Hee y Lee Ho-Deuk, Illustrated Book of Korean Medicinal Mushrooms, KyoHak Publishing Co., Ltd.*, pág. 472, 1ª edición, 1999).

- 30 Se ha publicado que el *Astragalus membranaceus* Bunge, que pertenece a las *Leguminosae*, comprende formononetina, isoliquiritigenina, ácido glucurónico, colina, betaína, ácido fólico, 2',4'-dihidroxi-5,6-dimetoxi-isoflavona, kumatakenina, etc. y que muestra acción cardíaca, actividad de disminución de la presión sanguínea, actividad diurética, actividad de tipo hormonal, etc. (*Chung, B. S. y col., Illustrated Crude Drug Encyclopedia, Youngrim Publishing Co. Ltd.*, 2ª edición, pág. 662-664, 1998; <http://www.tradimed.com>).

- 35 Se ha publicado que la *Schisandra chinensis*, que pertenece a las *Magnoliaceae*, comprende esquizandrina, gomisina A-Q, citral, alfa-ilangeno, ácido cítrico, ácido málico, beta-chamigreno, aceite graso, desoxiesquizandrina y etc. y para mostrar actividad vasodilatante, actividad de disminución de la presión sanguínea, actividad expectorante, etc. (*Chung, B. S. y col., Illustrated Crude Drug Encyclopedia, Youngrim Publishing Co. Ltd.*, 2ª edición, pág. 471-473, 1998; <http://www.tradimed.com>).

- 40 Se ha publicado que la *Artemisia capillaries*, que pertenece a las *Compositae*, comprende escoparona, ácido clorogénico, ácido cafeico, pineno, capipilina, capileno, capilarina, ácido esteárico, ácido palmítico, etc., y que muestra actividad de disminución de la presión sanguínea, actividad diurética, actividad de colagoga, etc. (*Chung, B. S. y col., Illustrated Crude Drug Encyclopedia, Youngrim Publishing Co. Ltd.*, 2ª edición, pág. 1016-1018, 1998; <http://www.tradimed.com>).

Sin embargo, no se ha publicado o descrito nada sobre el efecto terapéutico de extractos herbáceos combinados sobre la enfermedad hepática en ninguna de las referencias bibliográficas anteriores.

- 45 Por lo tanto, los presentes inventores se han esforzado para encontrar la formulación herbácea efectiva para potenciar la eficacia hepato-protectora y para estudiar el efecto farmacológico del extracto herbáceo combinado mencionado anteriormente y, finalmente, los presentes inventores han encontrado que el fármaco no purificado combinado descrito antes es eficaz en la prevención y en el tratamiento de enfermedades hepáticas como agente hepato-protector.

Descripción de la Invención

- 50 Problema Técnico

Según un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el extracto de hierbas combinadas con *Coriolus versicolor*, *Astragalus membranaceus* Bunge, *Schisandra chinensis* y *Artemisia*

capillaris para prevenir y tratar enfermedades hepáticas.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el extracto mencionado anteriormente como un ingrediente activo en una cantidad efectiva para prevenir y tratar enfermedades hepáticas, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 La presente invención también proporciona un uso del extracto descrito anteriormente para la fabricación de un medicamento empleado para tratar o prevenir la enfermedad hepática en un humano o mamífero.

La presente invención también proporciona un alimento funcional saludable que comprende el extracto descrito anteriormente para la prevención o la mejoría de la enfermedad hepática a través de la protección de las células hepáticas como un ingrediente activo en una cantidad efectiva para prevenir o mejorar la enfermedad hepática.

## 10 Solución Técnica

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende el extracto de hierbas combinadas que consiste en *Coriolus versicolor* y *Astragalus membranaceus* Bunge, como un ingrediente activo en una cantidad efectiva para prevenir y tratar enfermedades hepáticas, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, que comprende adicionalmente al menos una hierba seleccionada del grupo que consiste en *Schisandra chinensis* y *Artemisia capillaris* además de las hierbas combinadas mencionadas anteriormente para prevenir y tratar enfermedades hepáticas.

- 15

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un uso del extracto descrito anteriormente para la fabricación de un medicamento empleado para tratar o prevenir una enfermedad hepática en humanos o mamíferos.

- 20 En una realización preferida de la invención, el extracto descrito en la presente memoria comprende el extracto de hierbas combinadas, es decir, de *Coriolus versicolor* y *Astragalus membranaceus* Bunge, con la relación de mezcla basada en peso seco de cada hierba (% p/p) que oscila entre 0,1:1 y 10:1, preferiblemente, entre 0,5:1 y 5:1, más preferiblemente, entre 1:1 y 2:1, incluso más preferiblemente, en la presente invención para prevenir o tratar la enfermedad hepática.

- 25 En otra realización preferida de la invención, el extracto descrito en la presente memoria comprende el extracto de hierbas combinadas, es decir, de *Coriolus versicolor*, *Astragalus membranaceus* Bunge y *Schisandra chinensis*, con la relación de mezcla en base peso seco de cada hierba (% p/p) que oscila entre 0,1-10:0,1-10:1, preferiblemente, 0,5-5:0,5-5:1, más preferiblemente, 1-2: 1-2: 1, aún más preferiblemente, en la presente invención para prevenir o tratar la enfermedad hepática.

- 30 En otra realización preferida de la invención, el extracto descrito en la presente memoria comprende el extracto de hierbas combinadas, es decir, *Coriolus versicolor*, *Astragalus membranaceus* Bunge y *Artemisia capillaris*, con la relación de mezcla en base a peso seco de cada hierba (% p/p) que oscila entre 0,1-10: 0,1-10: 1, preferiblemente, 0,5-5: 0,5-5: 1, más preferiblemente, 1-2: 1-2: 1, aún más preferiblemente, en la presente invención para prevenir o tratar la enfermedad hepática.

- 35 En otra realización preferida de la invención, el extracto descrito en la presente memoria comprende el extracto de hierbas combinadas, es decir, *Coriolus versicolor*, *Astragalus membranaceus* Bunge, *Schisandra chinensis* y *Artemisia capillaris*, con la relación de mezcla en base a peso seco de cada hierba (% p/p) que oscila entre 0,1-10: 0,1-10: 0,1-10: 1, preferiblemente, 0,5-5: 0,5-5: 0,5-5: 1, más preferiblemente, 1-2: 1-2: 1-2: 1, aún más preferiblemente, en la presente invención para tratar o prevenir la enfermedad hepática.

- 40 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un alimento funcional saludable que comprende el extracto descrito antes para la prevención o la mejoría de la enfermedad hepática mediante la protección de las células hepáticas como ingrediente activo en una cantidad efectiva para prevenir y mejorar la enfermedad hepática.

- 45 La "enfermedad hepática" descrita en la presente memoria comprende hígado graso, hepatitis aguda o crónica, hepatomegalia, hepatofima, hepatocirrosis y cáncer hepático, preferiblemente, hígado graso, hepatocirrosis y hepatitis, más preferiblemente, hígado graso alcohólico, hígado graso no alcohólico, hígado graso diabético y hepatitis.

Las hierbas, que se pueden usar en la presente invención, incluyen los mismos géneros de plantas que serían evidentes para los especialistas en la técnica y que han sido usados para propósitos idénticos o similares y que pueden sustituirse para la prevención y el tratamiento de enfermedades hepáticas.

- 50 La composición inventiva de la presente invención se usa en su forma pulverizada, en su forma extraída o en su forma de extracto seco.

La anterior forma extraída de composición de fármaco sin purificar se puede obtener extrayendo con agua destilada, alcoholes inferiores tales como metanol, etanol y otros similares, o con mezclas de los mismos, preferiblemente con

agua.

El término "extracto" descrito en la presente memoria comprende extracto sin purificar, extracto de fracción insoluble en alcoholes inferiores y extracto soluble en disolvente no polar.

5 La expresión "extracto sin purificar" descrita en la presente memoria comprende el extracto soluble en agua destilada, alcoholes inferiores C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tales como metanol, etanol y otros similares, o las mezclas de los mismos, preferiblemente la disolución de mezcla con etanol y agua, más preferiblemente, disolución de etanol al 50-90% en agua.

10 La expresión "extracto de fracción insoluble en alcohol inferior" descrita en la presente memoria comprende el extracto preparado mediante las etapas: extraer el extracto sin purificar con una disolución de alcohol inferior tal como la disolución de mezcla con etanol y agua, más preferiblemente, disolución de etanol al 50-90% en agua para fraccionar en una fracción soluble en alcohol inferior y una fracción insoluble en alcohol inferior; y recolectar el extracto de fracción insoluble en alcohol inferior de la presente invención.

15 La expresión "extracto soluble en disolvente no polar" descrita en la presente memoria comprende el extracto preparado mediante las etapas: fraccionar el extracto sin purificar con disolvente no polar tal como hexano, cloroformo, diclorometano o acetato de etilo, preferiblemente, hexano; y recolectar el extracto soluble en disolvente no polar de la presente invención.

20 En la realización más preferida de la presente invención, el "extracto" de las hierbas combinadas consiste en un extracto sin purificar de *Coriolus versicolor*, extracto de fracción insoluble en alcohol inferior de *Astragalus membranaceus* Bunge y *Artemisia capillaris* y extracto soluble en disolvente no polar de *Schisandra chinensis*, en la composición inventiva aunque no pretender ser limitativo.

La composición farmacéutica para tratar enfermedades hepáticas podría contener aproximadamente 0,01 a 95 % p/p, preferiblemente de 0,5 a 80 % p/p de la anterior composición de hierbas de la presente invención en base al peso total de la composición.

Se puede preparar una composición de hierbas inventiva de acuerdo con la siguiente realización preferida.

25 Para la presente invención, la anterior composición de fármaco sin purificar se puede preparar mediante el siguiente procedimiento; las hierbas, es decir, *Coriolus versicolor*, *Astragalus membranaceus* Bunge, *Schisandra chinensis* y *Artemisia capillaris*, son lavadas, cortadas, secadas y mezcladas en la relación (p/p) apropiada. Dicha mezcla es pulverizada para obtener la forma pulverizada de la composición de fármaco sin purificar.

30 La anterior composición de fármaco sin purificar pulverizada se mezcla con de 5 a 20 volúmenes, preferiblemente, de 10 a 15 volúmenes de agua destilada, alcoholes tales como metanol, etanol y otros similares o mezclas de los mismos, preferiblemente, agua destilada o la mezcla de etanol y agua; y se maceran a una temperatura que oscila entre 0 y temperatura ambiente, preferiblemente entre 4 y 6°C, durante un periodo que oscila entre 12 y 48 horas, preferiblemente entre 20 y 24 horas, o se calienta con extracción a reflujo a una temperatura que oscila entre 80 y 120°C, preferiblemente por encima de 100°C, durante un periodo que oscila entre 1 y 24 horas, preferiblemente entre 2 y 5 horas con de 2 a 5 veces, o se extrae mediante sonicación, extracción a reflujo o convencional para obtener una forma de extracto acuoso de composición de fármaco sin purificar.

40 Adicionalmente, el extracto de hierbas se filtra y se concentra a 80-90°C a presión reducida. El extracto se concentra mediante destilación azeotrópica con 10-60 volúmenes de agua, de 1 a 5 veces y a continuación se seca mediante secado por congelación o secado a vacío para obtener un extracto sin purificar seco de composición de fármaco sin purificar.

45 El "extracto de fracción insoluble de alcohol inferior" de la invención de la respectiva hierba se puede preparar a través de las etapas: extraer el extracto crudo preparado en la etapa descrita anteriormente con una disolución de alcohol inferior tal como la disolución de mezcla de etanol y agua, más preferiblemente, la disolución de etanol al 50-90 % en agua en una cantidad que oscila entre 1 y 8 veces el peso en base al peso de extracto sin purificar, dejando en reposo a temperatura ambiente por un periodo que oscila entre 12 y 48 horas, preferiblemente, entre 18 y 24 horas para fraccionar en la fracción soluble en alcohol inferior y la fracción insoluble en alcohol inferior; y recolectar el extracto de fracción insoluble en alcohol inferior de la presente invención.

50 El "extracto soluble en disolvente no polar" inventivo de las respectivas hierbas se puede preparar con las siguientes etapas: fraccionamiento del extracto sin purificar preparado en la etapa descrita antes con hexano, cloroformo, diclorometano o acetato de etilo como disolvente no polar, preferiblemente, hexano en una cantidad que oscila entre 1 y 8 volúmenes, preferiblemente, 2 y 5 volúmenes en base al volumen de extracto sin purificar; y recolectar el extracto soluble en disolvente no polar de la presente invención.

55 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso para preparar el extracto de la presente invención tal como se ha descrito anteriormente para la preparación de una composición efectiva para prevenir o tratar enfermedades hepáticas.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende la forma pulverizada, la forma extraída o la forma de extracto seco del anterior extracto de fármaco sin purificar mediante el proceso descrito anteriormente como un ingrediente activo para prevenir y tratar enfermedades hepáticas.

5 La composición inventiva de la presente invención preparada mediante el proceso descrito anteriormente inhibe significativamente el nivel de GOT, GPT, colesterol LDL, expresión génica de HMG-CoA reductasa en tejido hepático, fibrosis de hígado en modelo experimental con ratas, y también aumenta el nivel en sangre de colesterol HDL. Cuando se evaluó la toxicidad oral aguda del extracto, el extracto no presentó ningún efecto aparente sobre la mortalidad, signos clínicos, cambios de peso corporal ni descubrimientos importantes en las necropsias.

10 La composición farmacéutica para tratar enfermedades hepáticas podría contener aproximadamente de 0,01 a 95 % p/p, preferiblemente de 0,5 a 80 % p/p de la composición de fármaco sin purificar descrito anteriormente de la presente invención en base al peso total de la composición.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un agente hepato-protector que comprende el extracto descrito anteriormente como ingrediente activo en una cantidad efectiva para prevenir y tratar enfermedades hepáticas.

15 La composición inventiva puede comprender adicionalmente un vehículo convencional, adyuvantes o diluyentes de acuerdo con un método de uso. Es preferible que dicho vehículo se uso como una sustancia apropiada de acuerdo con el método de uso y aplicación, pero no está limitado. Los diluyentes apropiados se enumeran en el texto escrito de "Remington's Pharmaceutical Science" (Mack Publishing Co., Easton, PA).

20 De aquí en adelante, los siguientes métodos de formulación y los siguientes excipientes son meros ejemplos y en modo alguno limitan la invención.

25 La composición de fármaco sin purificar de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar como una composición farmacéutica que contiene vehículos, adyuvantes o diluyentes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidones, goma arábiga, alginatos, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metil celulosa, polivinil pirrolidona, agua, metilhidroxi benzoato, propilhidroxi benzoato, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente rellenos, agentes anti-aglutinantes, agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes aromatizantes, emulsificantes, conservantes y otros similares. Las composiciones de la invención se pueden formular de tal modo que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de su administración a un paciente empleando cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica.

30 Por ejemplo, las composiciones de la presente invención se pueden disolver en aceites, propilenglicol u otros disolventes, que se usan habitualmente para producir una inyección. Los ejemplos adecuados de vehículos incluyen suero fisiológico, polietilenglicol, etanol, aceites vegetales, isopropil miristato, etc., pero no se limitan a ellos. Para administración tópica, los compuestos de la presente invención se pueden formular en forma de ungüentos y cremas.

35 Las formulaciones farmacéuticas que contienen la composición de fármaco sin purificar se pueden preparar en cualquier forma, tal como en forma para dosis oral (polvo, comprimido, cápsula, cápsula blanda, medicamento acuoso, jarabe, elixires, píldora, polvo, sobre, gránulo), o para preparación tópica (crema, ungüento, loción, gel, bálsamo, parche, pasta, disolución de espray, aerosol y otros similares), supositorios, o preparación inyectable estéril (disolución, suspensión, emulsión).

40 La composición de fármaco sin purificar de la presente invención en formas de dosificación farmacéutica se puede usar en la forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, y también puede usarse sola o en asociación apropiada, así como en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos.

45 La dosis deseable de la composición inventiva varía dependiendo de la condición y del peso del sujeto, de la gravedad, de la forma del fármaco, de la ruta y del periodo de administración, y puede ser elegida por el especialista en la técnica. Sin embargo, con el objetivo de obtener efectos deseables, generalmente se recomienda administrar en una cantidad que oscila entre 0,01 y 10 g/kg, preferiblemente, de 1 a 5 g/kg en peso/día de la composición inventiva de la presente invención. La dosis puede administrarse como una dosis sencilla o como dosis múltiples al día. En términos de composición, la composición de fármaco sin purificar debería estar presente entre el 0,01 y el 80% en peso, preferiblemente entre el 0,5 y el 50% en peso en base al peso total de la composición.

50 La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar a un sujeto animal tal como un mamífero (rata, ratón, animales domésticos o un humano) a través de diversas rutas. Se contemplan todos los modos de administración, por ejemplo, la administración puede ser oral, rectal o mediante inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracutánea, intratecal, epidural o intracerebroventricular.

55 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un alimento funcional saludable que comprende el extracto descrito anteriormente para la prevención o la mejoría de una enfermedad hepática a través

de la protección de las células hepáticas como ingrediente activo en una cantidad efectiva para prevenir o mejorar la enfermedad hepática.

La composición de fármaco sin purificar del alimento funcional saludable inventivo se usa en su forma pulverizada, su forma de extracto o su forma de extracto seco.

- 5 La composición de alimento funcional saludable para prevenir y mejorar enfermedades hepáticas podría contener entre un 0,01 y un 95 % p/p, preferiblemente entre 0,5 y 80 % p/p de la anterior composición de fármaco sin purificar de la presente invención en base al peso total de la composición.

- 10 La composición de fármaco sin purificar descrita anteriormente se puede añadir a un alimento, aditivo o bebida para la prevención y la mejoría de enfermedades hepáticas. Para el propósito de prevenir y mejorar enfermedades hepáticas, la cantidad de la composición de fármaco sin purificar descrita anteriormente en el alimento o bebida puede oscilar generalmente entre aproximadamente 0,1 y 15 % p/p, preferiblemente entre 1 y 10 % p/p del peso total de alimento para la composición de alimento saludable y de 1 a 30 g, preferiblemente de 3 a 10 g en la relación de 100 mL de la composición de bebida saludable.

- 15 Siempre que la composición de bebida saludable de la presente invención contenga la composición de fármaco sin purificar descrita anteriormente como componente esencial en la relación indicada, no existe ninguna limitación sobre el otro componente líquido, en donde el otro componente pueden ser varios edulcorantes o carbohidratos naturales, etc. tal como en una bebida convencional. Los ejemplos de los anteriores carbohidratos naturales son los monosacáridos tales como la glucosa, la fructosa, etc.; disacáridos tales como maltosa, sacarosa, etc.; azúcares convencionales tales como dextrina, ciclodextrina; y azúcares de alcohol tales como xilitol y eritritol, etc. Como otros edulcorantes diferentes a los mencionados anteriormente, se puede usar de forma favorable un edulcorante natural tal como la taumatina, un extracto de estevia tal como el levaudioside A, glicirizina y otros, y edulcorantes sintéticos tales como sacarina, aspartame y otros. La cantidad del carbohidrato natural descrito anteriormente generalmente oscila entre aproximadamente 1 y 20 g, preferiblemente entre 5 y 12 g en la relación de 100 mL de la presente composición de bebida.

- 25 Los otros componentes diferentes a los mencionados anteriormente son diversos nutrientes, una vitamina, un mineral o un electrolito, un agente aromatizante sintético, un agente colorante y un agente mejorador en caso de queso, chocolate y otros, ácido péctico y su sal, ácido algínico y su sal, ácido orgánico, adhesivo coloidal protector, agente de control de pH, estabilizante, un conservante, glicerina, alcohol, agente carbonizante usado en la bebida carbonatada, etc. El otro componente diferente a los mencionados anteriormente puede ser zumo de fruta para preparar zumo de fruta natural, bebida de zumo de fruta y bebida vegetal, en donde el componente se puede usar independientemente o en combinación. La relación de los componentes no es tan importante pero generalmente se encuentra en el intervalo entre aproximadamente 0 y 20 % p/p por 100 % p/p de la presente composición.

- 30 Los ejemplos de alimentos añadibles que comprenden la composición de fármaco sin purificar mencionada anteriormente son diversos alimentos, bebidas, gomas, complejos vitamínicos, alimentos mejoradores de la salud y otros similares.

#### Efectos ventajosos

La composición de hierbas combinadas de acuerdo con la presente invención muestra un potente efecto inhibitor en el nivel de un aumento de GOT, GPT, colesterol, triglicéridos, colesterol LDL, así como un efecto de aumento en el nivel de reducción de colesterol HDL junto con la prevención y el tratamiento de cirrosis hepática e hígado graso.

- 40 Las composiciones inventivas de acuerdo con la presente invención son útiles en la prevención y el tratamiento de las enfermedades hepáticas y se pueden usar como agentes hepato-protectores seguros y eficientes.

#### Breve descripción de las figuras

El anterior objetivo, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán con mayor claridad a partir de la siguiente descripción detallada considerada en conjunto con las figuras anexas, en las que:

- 45 Figura 1: muestra el cambio del nivel de GOT en el grupo tratado con el respectivo extracto del Ejemplo Comparativo 1 en ratas inducidas con CCL<sub>4</sub>.

Figura 2: muestra el cambio del nivel de GOT en el grupo tratado con el respectivo extracto preparado en el Ejemplo Comparativo 1 en ratas inducidas con CCL<sub>4</sub>.

- 50 Figura 3: muestra el efecto del cambio del nivel de GOT en el extracto combinado preparado en el Ejemplo 1 en el modelo de prevención de lesiones hepáticas inducidas con CCL<sub>4</sub>.

Figura 4: muestra el efecto del cambio del nivel GPT en el extracto combinado preparado en el Ejemplo 1 en el modelo de prevención de lesiones hepáticas inducidas con CCL<sub>4</sub>.

Figura 5: muestra el efecto del cambio del nivel de GOT en el extracto combinado preparado en el Ejemplo 1 en el modelo de prevención de lesiones hepáticas inducidas con CCL<sub>4</sub>.

Figura 6: muestra el efecto del cambio del nivel de GPT en el extracto combinado preparado en el Ejemplo 1 en el modelo de prevención de lesiones hepáticas inducidas con CCL<sub>4</sub>.

5 Figura 7: representa el cambio en los niveles de GOT y GPT en el modelo de cirrosis hepática inducida por DMN.

Figura 8: representa el efecto en la distribución de colágeno en el modelo de cirrosis hepática inducida por DMN.

Figura 9: muestra el cambio en los niveles de GOT y GPT en el grupo tratado con el extracto respectivo preparado en el Ejemplo Comparativo 2 y en el Ejemplo 2 en hígados grasos inducidos por alcohol en ratas.

10 Figura 10: muestra el cambio del nivel de colesterol en sangre en el grupo tratado con el extracto respectivo preparado en el Ejemplo Comparativo 2 y en el Ejemplo 2 en hígados grasos inducidos por alcohol en ratas.

Figura 11: muestra el efecto del cambio del nivel de triglicéridos en sangre del extracto preparado en el Ejemplo Comparativo 2 y en el Ejemplo 2 en hígados grasos inducidos por alcohol en ratas.

Figura 12: muestra el efecto del cambio del nivel de colesterol HDL en sangre del extracto preparado en el Ejemplo Comparativo 2 y en el Ejemplo 2 en hígados grasos inducidos por alcohol en ratas.

15 Figura 13: muestra el efecto del cambio del nivel de colesterol LDL en sangre del extracto preparado en el Ejemplo Comparativo 2 y en el Ejemplo 2 en hígados grasos inducidos por alcohol en ratas.

Figura 14: muestra el efecto del cambio del nivel de colesterol hepático del extracto preparado en el Ejemplo Comparativo 2 y en el Ejemplo 2 en hígados grasos inducidos por alcohol en ratas.

20 Figura 15: muestra el efecto del cambio del nivel de triglicéridos hepáticos del extracto preparado en el Ejemplo Comparativo 2 y en el Ejemplo 2 en hígados grasos inducidos por alcohol en ratas.

Figura 16: representa el efecto del cambio morfológico del tejido hepático del extracto combinado preparado en el Ejemplo 2 en hígados grasos inducidos por alcohol en ratas.

Figura 17: muestra el efecto del cambio de expresión génica de HMG-CoA reductasa del extracto combinado preparado en el Ejemplo 2 en hígados grasos inducidos por alcohol en ratas.

25 Mejor método para llevar a la práctica la invención

Los siguientes Ejemplos y Ejemplos Experimentales pretenden ilustrar con más detalle la presente invención sin limitar su alcance.

#### Modo para la invención

#### **Ejemplo Comparativo 1. Preparación de los respectivos extractos de hierbas (1)**

30 1-1. Extracto sin purificar 1 de Coriolus versicolor (CV30E)

Se lavaron 500 g de Coriolus versicolor adquiridos en el mercado de Kyung-dong localizado en Seúl y se añadieron 10 L de agua a los mismos. La disolución se sometió a extracción a reflujo con agua destilada a 100°C dos veces en la 1ª etapa. El extracto obtenido en la 1ª etapa se filtró y se concentró a 105°C para preparar 800 mL de concentrado. El concentrado se secó a 60°C para obtener 62,0 g de extracto sin purificar seco de Coriolus versicolor (Rendimiento: 12,4 %).

35

1-2. Extracto sin purificar de Astragalus membranaceus Bunge (AM80M)

Se lavaron 800 g de Astragalus membranaceus Bunge adquiridos en el mercado de Kyung-dong localizado en Seúl y se añadieron 10 L de disolución de etanol al 70%. La disolución se sometió a extracción a reflujo a 100°C dos veces como 1ª etapa. El extracto obtenido en la 1ª etapa se filtró y se concentró a 105°C para preparar 750 mL de concentrado. El concentrado se secó a 60°C para obtener 153,6 g de extracto sin purificar seco de Astragalus membranaceus Bunge (Rendimiento: 19,2 %).

40

1-3. Extracto sin purificar de Schisandra chinensis (SC80M)

Se lavaron 500 g de Schisandra chinensis adquiridos en el mercado de Kyung-dong localizado en Seúl y se añadieron 10 L de etanol al 70%. La disolución se sometió a extracción a reflujo a 100°C dos veces en la 1ª etapa. El extracto obtenido en la 1ª etapa se filtró y se concentró a 105°C para preparar 900 mL del concentrado. El concentrado se secó a 60°C para obtener 183,0 g de extracto seco sin purificar de Schisandra chinensis (Rendimiento: 36,6 %).

45

1-4. Extracto sin purificar de Artemisia capillaris (ACDW)

Se lavaron 500 g Artemisia capillaris adquiridos en el mercado de Kyung-dong localizado en Seúl y se añadieron 10 L de agua destilada. La disolución se sometió a extracción a reflujo a 100°C dos veces en la 1ª etapa. El extracto obtenido en la 1ª etapa se filtró y se concentró a 105°C para preparar 650 mL de concentrado. El concentrado se secó a 60°C para obtener 91,5 g de extracto seco sin purificar de Artemisia capillaris (Rendimiento: 18,3%).

**Ejemplo Comparativo 2. Preparación de los respectivos extractos de hierbas (2)**

2-1. Extracto insoluble en alcohol inferior de Coriolus versicolor (CO)

Se lavaron 1000 g de Coriolus versicolor adquiridos en el mercado de Kyung-dong localizado en Seúl y se añadieron 10 L de agua destilada. La disolución se sometió a extracción a reflujo con agua destilada a 100°C durante 2 horas dos veces en la 1ª etapa. El extracto obtenido en la 1ª etapa se filtró y se concentró a 105°C para preparar 1000 mL de concentrado. Se dejó reposar a temperatura ambiente una disolución de etanol al 70% preparada añadiendo etanol al 95% al concentrado durante 12 horas para separar la capa de sobrenadante y la capa de precipitado, y el precipitado se secó a 60°C para obtener 31,5 g de extracto seco insoluble en alcohol inferior de Coriolus versicolor (Rendimiento: 3,15 %, designado como CO a partir de aquí).

2-2. Extracto sin purificar de Astragalus membranaceus Bunge (AS)

Se lavaron 1000 g de Astragalus membranaceus Bunge adquiridos en el mercado de Kyung-dong localizado en Seúl y se añadieron 10 L de disolución de etanol al 95%. La disolución se sometió a extracción a reflujo a 95°C durante 2 horas dos veces en la 1ª etapa. El extracto obtenido en la 1ª etapa se filtró y se concentró a 105°C para preparar 1000 mL de concentrado. El concentrado se secó a 60°C para obtener 80,3 g de extracto seco sin purificar de Astragalus membranaceus Bunge (Rendimiento: 8,03 %, designado como AS a partir de aquí).

2-3. Extracto soluble en disolvente no polar de Schisandra chinensis (AR)

Se lavaron 1000 g de Schisandra chinensis adquiridos en el mercado de Kyung-dong localizado en Seúl y se añadieron 10 L de disolución de etanol al 95%. La disolución se sometió a extracción a reflujo a 95°C durante 2 horas en la 1ª etapa. El extracto obtenido en la 1ª etapa se filtró y se concentró a 105°C para preparar 1000 mL de concentrado. Se añadió una cantidad equivalente de hexano para fraccionar entre una capa acuosa y una capa soluble en hexano y la capa de hexano se recolectó para obtener el extracto soluble en hexano de Schisandra chinensis (Rendimiento: 1,21 %, designado como AR a partir de aquí).

2-4. Extracto insoluble en alcohol inferior de Artemisia capillaris (SC)

Se lavaron 1000 g de Artemisia capillaris adquiridos en el mercado de Kyung-dong localizado en Seúl y se añadieron 10 L de agua destilada. La disolución se sometió a extracción a reflujo con agua destilada a 100°C durante 2 horas dos veces en la 1ª etapa. El extracto obtenido en la 1ª etapa se filtró y se concentró a 105°C para preparar 1000 mL de concentrado. Se dejó reposar a temperatura ambiente una disolución de etanol al 70% preparada añadiendo etanol al 95% al concentrado durante 12 horas para separar la capa de sobrenadante y la capa de precipitado, y el precipitado se secó a 60°C para obtener 119,7 g de extracto seco insoluble en alcohol inferior de Artemisia capillaris (Rendimiento: 11,97 %, designado como SC a partir de aquí).

**Ejemplo 1. Preparación de formulaciones inventivas combinadas (1)**

1-1. Preparación de H1 inventiva

Cada extracto de Coriolus versicolor y Astragalus membranaceus Bunge preparado en el Ejemplo Comparativo 1 se mezcló a una relación de peso de 1:1 para preparar una formulación combinada inventiva (designada H1 a partir de aquí).

1-2. Preparación de H2 inventiva

Cada extracto de Coriolus versicolor, Astragalus membranaceus Bunge y Schisandra chinensis preparado en el Ejemplo Comparativo 1 se mezcló a una relación de peso de 1:1:1 para preparar una formulación combinada inventiva (designada H2 a partir de aquí).

1-3. Preparación de H3 inventiva

Cada extracto de Coriolus versicolor, Astragalus membranaceus Bunge y Artemisia capillaris preparado en el Ejemplo Comparativo 1 se mezcló a una relación de peso de 1:1:1 para preparar una formulación combinada inventiva (designada H3 a partir de aquí).

1-4. Preparación de H4 inventiva

Cada extracto de Coriolus versicolor, Astragalus membranaceus Bunge, Schisandra chinensis y Artemisia capillaris

preparado en el Ejemplo Comparativo 1 se mezcló a una relación de peso de 1:1:1:1 para preparar una formulación combinada inventiva (designada H4 a partir de aquí).

## **Ejemplo 2. Preparación de formulaciones inventivas combinadas (2)**

### 2-1. Preparación de HF1 inventiva

- 5 Cada extracto de *Coriolus versicolor* y *Astragalus membranaceus* Bunge preparado en el Ejemplo Comparativo 2 se mezcló a una relación de peso de 1:1 para preparar una formulación combinada inventiva (designada HF-1 a partir de aquí).

### 2-2. Preparación de HF2 inventiva

- 10 Cada extracto de *Coriolus versicolor*, *Astragalus membranaceus* Bunge y *Schisandra chinensis* preparado en el Ejemplo Comparativo 2 se mezcló a una relación de peso de 1:1:1 para preparar una formulación combinada inventiva (designada HF2 a partir de aquí).

### 2-3. Preparación de HF3 inventiva

- 15 Cada extracto de *Coriolus versicolor*, *Astragalus membranaceus* Bunge y *Artemisia capillaris* preparado en el Ejemplo Comparativo 2 se mezcló a una relación de peso de 1:1:1 para preparar una formulación combinada inventiva (designada HF3 a partir de aquí).

### 2-4. Preparación de HF4 inventiva

- 20 Cada extracto de *Coriolus versicolor*, *Astragalus membranaceus* Bunge, *Schisandra chinensis* y *Artemisia capillaris* preparado en el Ejemplo Comparativo 2 se mezcló a una relación de peso de 1:1:1:1 para preparar una formulación combinada inventiva (designada HF4 a partir de aquí).

## **Ejemplo Experimental 1. Efecto sobre lesión hepática crónica inducida por CCl<sub>4</sub> en el modelo de rata**

Con el objetivo de investigar el efecto inhibitor del extracto combinado inventivo obtenido en el Ejemplo 1 sobre la lesión hepática comparado con el Ejemplo Comparativo 1, se llevó a cabo el siguiente experimento en el procedimiento.

### 1-1. Reactivos y animales experimentales

- 25 CCl<sub>4</sub> (Sigma Co.), aceite de oliva (Sigma Co.), Alanina amino transferasa (ALT, GPT, Stanbio Co.) y aspartato amino transferasa (AST, GOT, Stanbio Co.) se adquirieron en compañías comerciales para uso experimental.

- 30 Se usaron ratas macho Sprague-Dawley que pesaban aproximadamente 200 g (Daehan Biolink Co. Ltd., Corea) en el experimento y se dejó que accedieran libremente al pienso (Harlan, Teklan, EE.UU.) y al agua de bebida. Todos los animales fueron mantenidos en un entorno controlado con temperaturas de 21°C-24°C y humedades de 60%-80% con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad durante al menos una semana antes de su uso. El peso medio de los ratones de cada grupo fue optimizado de acuerdo a cada grupo y se usaron 10 ratones por grupo.

### 1-2. Efecto de cada hierba respectiva sobre la lesión hepática crónica inducida por CCl<sub>4</sub>

- 35 Para la estimación del efecto sobre la lesión hepática, el grupo normal fue tratado solo con disolución salina. La disolución mixta con aceite de oliva y CCl<sub>4</sub> (1:3) fue administrada a cada rata del experimento con una dosis de 1,0 mL/kg durante tres días, intraperitonealmente, para inducir una hepatotoxicidad aguda para su uso como grupo de control. Una hora después de la inducción, se administraron oralmente concentraciones diferentes del extracto descrito en el Ejemplo Comparativo 1 suspendido en disolución salina a las ratas con una dosis de 1,0 mL/kg durante tres días como grupos de ensayo, y la cantidad equivalente de disolución salina fue administrada únicamente al grupo de control negativo. 18 horas después de la inducción, se reunieron las muestras sanguíneas procedentes de vena suborbital y se centrifugaron durante 20 minutos a 3.000 rpm. Se determinaron los niveles GOT y GPT de todas las muestras usando un aparato BT2000+ (SEAC Co.).

- 40 Como se puede observar en las Figuras 1 y 2, el grupo normal tratado sólo con disolución salina mostró aproximadamente 200 U/L de nivel de GOT y 74 U/L de nivel de GPT, mientras que el grupo de control tratado con la disolución mixta con aceite de oliva y CCl<sub>4</sub> (1:1) mostró aproximadamente 461 U/L de nivel de GOT y 168 U/L de nivel de GPT. Sin embargo, los grupos de ensayo tratados con cada extracto de hierba mostraron actividad hepatoprotectora en el orden de *Coriolus versicolor*, *Schisandra chinensis*, *Astragalus membranaceus* Bunge y *Artemisia capillaris* (véanse las Figuras 1 y 2).

Por consiguiente, se confirma que el extracto inventivo de la presente invención es efectivo para aliviar la función hepática.

- 50 1-3. Efecto de las formulaciones combinadas sobre la lesión hepática crónica inducida por CCl<sub>4</sub>

Para la estimación del efecto sobre la lesión hepática, el grupo normal fue tratado solo con disolución salina. La disolución mixta con aceite de oliva y  $\text{CCl}_4$  (1:1) se administró a todas las ratas del experimento con una dosis de 1,0 mL/kg durante tres días, intraperitonealmente, para inducir una hepatotoxicidad aguda para su uso como grupo de control. Una hora después de la inducción, se administraron oralmente a las ratas concentraciones diferentes de extracto combinado inventivo descrito en el Ejemplo 1, es decir, H1, H2, H3 y H4, suspendido con disolución salina, con una dosis de 1 g/60kg durante tres días como grupos de ensayo y la cantidad equivalente de disolución salina se trató solo como control negativo. 18 horas después de la inducción, se reunieron las muestras sanguíneas procedentes de vena suborbital y se centrifugaron durante 20 minutos a 3.000 rpm. Se determinaron los niveles GOT y GPT de todas las muestras usando un aparato BT2000+ (SEAC Co.).

Como se puede observar en las Figuras 3 y 4, el grupo de control tratado con la disolución mixta con aceite de oliva y  $\text{CCl}_4$  (1:1) mostró aproximadamente 462 U/L de nivel de GOT y 186 U/L de nivel de GPT, mientras que el grupo de ensayo con H1 mostró aproximadamente 355 U/L de nivel de GOT y 142,1 U/L de nivel de GPT. Los niveles de GOT y de GPT del grupo de ensayo tratado con H2 fueron similares a los del grupo de ensayo tratado con H3, que mostró una actividad hepatoprotectora más potente que el grupo tratado con H1. Sin embargo, los grupos de ensayo tratados con H4 mostró una actividad hepato-protectora más potente entre ellos (véanse las Figuras 3 y 4).

Por consiguiente, se confirma que el extracto inventivo de la presente invención es efectivo para tratar y prevenir la enfermedad hepática.

#### 1-4. Efecto de formulaciones combinadas sobre lesión hepática crónica inducida por $\text{CCl}_4$

Para la estimación del efecto aliviador sobre la lesión hepática, el grupo normal fue tratado solo con disolución salina durante cuatro días. La disolución mixta con aceite de oliva y  $\text{CCl}_4$  (1:1) se administró a todas las ratas del experimento con una dosis de 1,0 mL/kg durante tres días, intraperitonealmente, para inducir una hepatotoxicidad aguda para su uso como grupo de control. Una hora después de la inducción, se administró oralmente a las ratas concentraciones diferentes de extracto combinado inventivo descrito en el Ejemplo 1, es decir, H1, H2, H3 y H4, suspendido en disolución salina, con una dosis de 1 g/60kg durante cuatro días como grupos de ensayo, y la cantidad equivalente de disolución salina fue tratada solamente como control negativo. En el último día de ensayo, se reunieron muestras de 1,5 mL de sangre de los animales del experimento anestesiados y se fijaron con perfusión. La muestra de sangre se centrifugó durante 20 minutos a 3.000 rpm, y se determinaron los niveles de GOT y de GPT de todas las muestras usando un aparato CH100+ (SEAC Co.).

Como se puede observar en las Figuras 5 y 6, el grupo de control tratado con la disolución mixta de aceite de oliva y  $\text{CCl}_4$  (1:1) mostró aproximadamente 488 U/L de nivel de GOT y 201,4 U/L de nivel de GPT, mientras que los grupos tratados con H1, H2 y H3 mostraron aproximadamente 307,6, 304,1 y 107,9 U/L de nivel de GOT y 136,4, 99,2 y 97,3 U/L de nivel de GPT, respectivamente. Los niveles de GOT y GPT del grupo de ensayo tratado con H4 fueron similares a los de los grupos de ensayo tratados con H2 y H3, que mostraron una actividad de tratamiento bastante potente (Véanse las Figuras 5 y 6).

#### **Ejemplo Experimental 2. Efecto sobre la distribución de Colágeno e inhibición de nivel de GOT y GPT en el modelo de rata**

Con el objetivo de investigar la mejora del efecto del extracto inventivo obtenido en el Ejemplo 1 sobre la cirrosis hepática, se llevó a cabo el siguiente experimento en el procedimiento.

##### 2-1. Reactivos y animales experimentales

DMN (dimetilnitrosoamina, Sigma Co.), alanina amino transferasa (ALT, GPT, Stanbio Co.) y aspartato amino transferasa (AST, GOT, Stanbio Co.) se adquirieron de compañías comerciales para su uso experimental.

Se usaron ratas Wister que pesaban aproximadamente 270 g en el experimento y se les dejó acceder al pienso (Harlan, tekla, EE.UU.) y al agua de beber. Todos los animales fueron mantenidos en un entorno controlado con temperaturas de 21°C-24°C y una humedad de 60%-80% con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas durante al menos una semana antes de su uso.

##### 2-2. Efecto sobre la distribución de colágeno y efecto inhibidor sobre GOT y GPT

Para la estimación del efecto sobre la cirrosis hepática, se administró un 1% de DMN (Dimetilnitrosamina) a cada rata del experimento con una dosis de 40 mg/kg/día durante tres días intra-peritonealmente para inducir cirrosis hepática. El extracto combinado inventivo preparado en el Ejemplo 1 suspendido en disolución salina se administró oralmente a las ratas durante dos semanas en una cantidad de 1 g/60 kg de peso en los grupos de ensayo y la cantidad equivalente de disolución salina se trató solo como negativo de control. En el día de ensayo final, se reunieron muestras de 1,5 mL de sangre procedente de los animales del experimento anestesiados y se fijaron con perfusión. La muestra de sangre se centrifugó durante 20 minutos a 3000 rpm, y se determinaron los niveles de GOT y GPT de todas las muestras usando un aparato CH100+ (SEAC Co.).

Para examinar la distribución de colágeno en el tejido hepático, se usó el método de tinción tricromo Masson que

tiñe solo la parte de colágeno, y el tejido hepático aislado se embebió en un analizador de tejido automático (Citadel 2000, Shandon Co.) y se cortó en láminas de un espesor de 4 micrómetros usando un micrótopo de tejido (LEICA RM2145). Se seleccionaron cinco lesiones por tejido y se determinó la relación fibrinosa mediante un sistema de análisis de imágenes. Se calcularon los valores medios de la relación y se transformaron en la cantidad de colágeno.

- 5 Como se puede observar en la Figura 7, los grupos tratados con extracto inventivo obtenido en el Ejemplo 1 inhibieron de forma significativa el nivel de GOT y de GPT en el modelo de rata de lesión hepática. Los grupos tratados con H2 y H3 mostraron una actividad inhibidora más potente que el tratado con H1, y el grupo tratado con H4 mostró la actividad más potente entre los grupos de ensayo (significancia:  $p < 0,0001$ , véase la Figura 7).

- 10 Adicionalmente, la cantidad de colágeno de los grupos tratados con el extracto inventivo H1, H2, H3 y H4, obtenidos en el Ejemplo 1 mostraron 1,83, 1,5, 1,33 y 1,66, respectivamente, mientras que los del grupo de control y los grupos normales mostraron 2,44 y 1,33, respectivamente (véase la Figura 8).

Por consiguiente, se confirma que el extracto inventivo de la presente invención es efectivo para inhibir el progreso de la cirrosis hepática de forma significativa.

### **Ejemplo experimental 3. Efecto sobre el hígado graso inducido por alcohol en el modelo de rata**

- 15 Con el objetivo de investigar el efecto inhibidor del extracto combinado inventivo obtenido en el Ejemplo 2 sobre hígado graso en comparación con el Ejemplo Comparativo 2, se llevó a cabo el siguiente experimento en el procedimiento.

#### **3-1. Animales experimentales y Pretratamiento**

- 20 Se usaron ratas macho Sprague-Dawley que pesaban aproximadamente 200 g (Samtaco Co. Ltd., Corea) en el experimento y se les permitió acceder libremente al pienso y al agua de bebida. Todos los animales se mantuvieron en un entorno controlado con temperaturas a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  y una humedad a  $60 \pm 5\%$  con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad durante al menos una semana antes del uso. El peso medio de los ratones de cada grupo se optimizó de acuerdo a cada grupo y se usaron 10 ratones en cada grupo.

#### **3-2. Pretratamiento**

- 25 Para inducir el hígado graso, se administró pienso animal (AIN 76 que contenía un 1% de colesterol, Feedlab Co. Ltd.) oralmente en las ratas del experimento durante 21 días. Adicionalmente, se administró etanol al 35% oralmente a las ratas del experimento en una cantidad de 10 mg/kg desde ocho días después de la administración de pienso para usar como grupo de control y el extracto preparado en el Ejemplo Comparativo 2 y en el Ejemplo 2 se administró oralmente a las ratas 10 días después de la administración de pienso con una dosis de 50 mg/kg. 21 días después de la administración oral, los animales experimentales fueron anestesiados con éter para ser usados en los siguientes experimentos.

#### **3-3. Efecto sobre el nivel de GOT y de GPT en el hígado graso**

- 35 Para determinar el efecto sobre el cambio de la concentración en sangre de GOT y GPT debido al extracto combinado inventivo obtenido en el Ejemplo 2 en el hígado graso, se llevó a cabo el siguiente ensayo mediante el procedimiento descrito en la bibliografía (Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW: "Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase". Clin Chem 24: 58, 1978).

Tras llevar a cabo un método similar al método descrito en el apartado 3-2, se reunió la sangre extraída de animales experimentales anestesiados. La muestra sanguínea se centrifugó durante 20 minutos a  $4.550 \times g$ , y se determinaron los niveles de GOT y GPT en todos los sueros usando un aparato BT2000+ (SEAC Co.).

- 40 Como se puede observar en la Figura 9, el grupo de ensayo tratado con las respectivas hierbas preparadas en el Ejemplo Comparativo 2 no pudieron reducir significativamente el aumento del nivel de GOT y GPT inducido por el colesterol al 1% y el alcohol al 35%, mientras que el tratado con las hierbas combinadas preparadas en el Ejemplo 2 redujo significativamente el nivel de GOT y GPT, entre otros, el grupo tratado con HF4 (GOT: 131,2 mg/dL, GPT: 89,6 mg/dL) mostró el efecto reductor más potente sobre el aumento de GOT y GPT en el modelo de hígado graso inducido por alcohol (véase la Figura 9).

#### **3-4. Efecto sobre la concentración de lípidos en el hígado graso**

Para determinar el efecto del cambio de la concentración de lípidos en sangre en el hígado graso, se llevó a cabo el siguiente ensayo mediante el procedimiento descrito en la bibliografía (Trinder, P. "Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor". Ann Clin Bio Chem 6: 24-27, 1969).

- 50 Tras llevar a la práctica el método similar al método descrito en 3-2, se reunió la sangre procedente de los animales experimentales anestesiados. La muestra de sangre se centrifugó durante 20 minutos a  $4.550 \times g$ , y se determinaron los niveles de colesterol, triglicérido, HDL y LDL en suero mediante un aparato BT2000+ (SEAC Co.).

Resultado del nivel de colesterol

Como se puede observar en la Figura 10, el grupo de control tratado con colesterol al 1% y alcohol al 35% (158,1 mg/dL) mostró un incremento de dos veces del nivel en sangre de colesterol en comparación con el grupo normal no tratado (65,6 mg/dL) mientras que los grupos tratados con extractos preparados en el Ejemplo Comparativo 2 y en el Ejemplo 2 mostraron un efecto reductor significativo en el aumento de colesterol, entre otros, el grupo tratado con HF3 (91,5 mg/dL) y HF4 (88,2 mg/dL) mostró el efecto reductor más potente sobre el aumento del nivel de colesterol en sangre en el modelo de hígado graso inducido por alcohol (véase la Figura 10).

Resultado del nivel de triglicéridos

Como se puede observar en la Figura 11, el grupo de control tratado con colesterol al 1% y con alcohol al 35% (173,2 mg/dL) mostró un aumento de tres veces en el nivel de triglicéridos en sangre en comparación con el grupo normal no tratado (63,6 mg/dL), mientras que los grupos tratados con extractos preparados en el Ejemplo Comparativo 2 y en el Ejemplo 2 mostraron un efecto reductor significativo sobre el aumento de triglicéridos, entre otros, el grupo tratado con HF1 (120,2 mg/dL) mostró el efecto reductor más potente sobre el nivel incrementado de triglicéridos en sangre en el modelo de hígado graso inducido por alcohol (véase la Figura 11).

Resultado del nivel de colesterol HDL y colesterol LDL

Tal como se puede observar en la Figura 12, el grupo de control tratado con colesterol al 1% y alcohol al 35% (53,8 mg/dL) mostró un nivel disminuido de colesterol HDL en sangre en comparación con el grupo normal no tratado (55,4 mg/dL) mientras que los grupos tratados con extractos preparados en el Ejemplo Comparativo 2 y el Ejemplo 2 mostró un efecto de aumento significativo sobre el HDL reducido (véase la Figura 12).

Como se puede observar en la Figura 13, el grupo de control tratado con colesterol al 1% y alcohol al 35% (168,7 mg/dL) mostró un aumento de más de tres veces en el nivel de colesterol LDL en sangre en comparación con el grupo normal no tratado (53,2 mg/dL), mientras que los grupos tratados con extractos preparados en el Ejemplo Comparativo 2 y en el Ejemplo 2 mostró un efecto reductor significativo sobre el aumento de LDL, de forma similar al resultado de la Figura 10, entre otros, el grupo tratado con HF4 (114,8 mg/dL) mostró el efecto reductor más potente sobre el aumento del nivel de LDL en sangre en el modelo de hígado graso inducido por alcohol (véase la Figura 13).

A través de los resultados descritos anteriormente, se ha confirmado que los extractos preparados en el Ejemplo Comparativo 2 y en el Ejemplo 2 mostraron un efecto reductor potente sobre los niveles de colesterol, triglicéridos y colesterol LDL incrementados, así como un efecto de aumento sobre el nivel de colesterol HDL que resulta de la inhibición de la acumulación de lípidos en suero.

**Ejemplo Experimental 4. Determinación del cambio de contenido de lípidos en el hígado**

Con el objetivo de investigar el efecto inhibitor del extracto combinado inventivo obtenido en el Ejemplo 2 sobre el contenido de lípidos en el hígado graso en comparación con el Ejemplo Comparativo 2, se llevó a cabo el siguiente experimento de acuerdo con el método descrito en la bibliografía (Zlatkis, A y Zak, B. "Study of a new cholesterol reagent". *Anal Biochem*, 29, 143-148, 1969).

Tras llevar a cabo el método similar al método descrito en 3-2, se extrajo el hígado de las ratas experimentales y se añadieron 2 mL de disolución salina a 1 g de sección de hígado. El tejido se molió con un homogeneizador y se añadieron 3 mL de disolvente de mezcla CM (cloroformo:metanol = 2:1). Las etapas descritas antes se repitieron tres veces y la suspensión se centrifugó a la velocidad 3.000 rpm durante 10 minutos. La capa de cloroformo se recuperó y se eliminó el disolvente mediante gas nitrógeno. Se añadió Triton X-100 que comprende cloroformo para prevenir el enranciamiento de los lípidos y se eliminó el cloroformo restante mediante uso de gas nitrógeno nuevamente. Se determinó el nivel de colesterol total y de triglicéridos usando un aparato BT2000+ (SEAC Co.).

Resultado de nivel de colesterol total

Como puede observarse en la Figura 14, el grupo de control tratado con colesterol al 1% y alcohol al 35% (308,43 mg/dL) mostró un aumento de más de dos veces en el nivel de colesterol total en sangre en comparación con el grupo normal no tratado (139,75 mg/dL), mientras que los grupos tratados con extractos preparados en el Ejemplo Comparativo 2 y en el Ejemplo 2 mostraron un efecto reductor significativo sobre el aumento de colesterol total, entre otros, los grupos tratados con HF2, HF3 y HF4 (HF2: 189,87 mg/dL, HF3: 185,54 mg/dL, HF4: 169,85 mg/dL) mostraron un efecto reductor potente sobre el aumento de nivel de colesterol total en sangre (véase la Figura 14).

Resultado del nivel de triglicéridos totales

Como se puede observar en la Figura 15, el grupo de control tratado con colesterol al 1% y alcohol al 35% (173,2 mg/dL) mostró un aumento de más de dos veces en el nivel de triglicéridos totales en sangre en comparación con el grupo normal no tratado (63,6 mg/dL), mientras que los grupos tratados con extracto preparado en el Ejemplo Comparativo 2 y en el Ejemplo 2 mostraron un efecto reductor significativo sobre el aumento de los triglicéridos

totales, de forma similar al resultado de la Figura 14, entre otros, los grupos tratados con HF2, HF3 y HF4 (HF2: 165,5 mg/dL, HF3: 158,1 mg/mL y HF4: 143,0 mg/dL) mostraron un efecto reductor potente sobre el aumento del nivel de triglicéridos en sangre (véase la Figura 15).

Por consiguiente, se ha confirmado que los grupos tratados con extractos preparados en el Ejemplo Comparativo 2 y en el Ejemplo 2 mostraron un efecto reductor potente sobre el aumento del nivel en sangre de colesterol y triglicéridos en el hígado.

#### **Ejemplo Experimental 5. Determinación del cambio de tejido hepático**

Con el objetivo de investigar el efecto del extracto combinado inventivo (HF2, HF3 y HF4) obtenido en el Ejemplo 2, sobre el cambio morfológico del tejido hepático en comparación con el Ejemplo Comparativo, se llevó a cabo el siguiente experimento de acuerdo con el método descrito en la bibliografía (tinción de hematoxilina y eosina (H&E), <http://www.protocol-online.org>).

Tras llevar a cabo el método similar al método descrito en 3-2, se extrajo el hígado y el tejido hepático se fijó con formalina al 10% para teñir mediante el método de tinción H&E (tinción de hematoxilina y eosina (H&E), <http://www.protocol-online.org>).

#### **Resultados de cambio de la morfología hepática**

Como puede observarse en la Figura 16, el grupo de control tratado con colesterol al 1% y alcohol al 35% mostró un aumento del número de gotas de lípidos en el entorno de los vasos sanguíneos y una morfología anormal en la forma de las células hepáticas, en comparación con el grupo normal no tratado, mientras que los grupos tratados con HF4 mostraron una morfología similar con respecto al número de gotas de lípidos, así como en la disposición general del tejido hepático con respecto al grupo normal (véase la Figura 16).

Por consiguiente, se ha confirmado que los grupos tratados con HF2, HF3 y HF4, particularmente, con HF4, mostraron un efecto inhibidor potente sobre el cambio morfológico del tejido hepático provocado por hígado graso hepático.

#### **Ejemplo Experimental 6. Cambio de la expresión génica de HMG-CoA**

Se ha publicado que la enzima reductasa HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A) desempeña un papel importante en la regulación de la síntesis y el mecanismo de disociación del colesterol y el número de enzimas aumenta con la ingesta de alcohol, lo que da como resultado un incremento de la síntesis de colesterol. Por consiguiente, con el objetivo de investigar el efecto del extracto combinado inventivo (HF2, HF3 y HF4) obtenido en el Ejemplo 2, sobre el cambio de la expresión génica de la HMG-CoA-reductasa, se llevó a cabo el siguiente experimento de acuerdo con el método descrito en la bibliografía (Gene C. N, Reed C. H. "Selective compensatory induction of hepatic HMG-CoA reductase in response to inhibition of cholesterol absorption". Exp. Biol. Mes. 231: 559-569, 2006).

Después de llevar a cabo el método similar al método descrito en 3-2, se extrajo el hígado y se aisló el ARN del tejido hepático usando un reactivo Trizole (Gibco, BRL, EE.UU.). El ARN extraído se sintetizó para ADNc usando una transcriptasa M-MLV inversa (Gibco, BRL, EE.UU.) y se llevó a cabo RT-PCR usando cebadores contra el gen de HMG-CoA reductasa (SEC ID N°: 1 (F): TGA GGG AAC CCT GAC ACT TA, SEC ID N°: 2 (R): CTT CAA ATT TTG GGC ACT CA).

#### **Resultado de la expresión génica de HMG-CoA**

Como puede observarse en la Figura 17, el grupo de control (1,852) tratado con colesterol al 1% y con alcohol al 35% mostró un aumento de la cantidad de expresión génica de HMG-CoA en comparación con el grupo normal no tratado (0,805), mientras que los grupos tratados con HF2, HF3 y HF4 (HF2: 1,633, HF3: 1,290 y HF4: 1,224) mostraron una reducción de 1,5 veces en el nivel de expresión génica en comparación con el grupo de control.

Por consiguiente, se ha confirmado que los grupos tratados con HF2, HF3 y HF4, particularmente con HF4, mostraron un efecto inhibidor potente sobre la expresión génica de tejido hepático provocada por hígado graso hepático que da como resultado la producción de colesterol (véase la Figura 17).

#### **Ejemplo Experimental 7. Evaluación de la toxicidad aguda.**

Para examinar la toxicidad del extracto inventivo, se llevaron a cabo ensayos de toxicidad aguda con ratas.

Las 15 ratas SD machos y hembras se dividieron en 3 grupos y se administraron tres dosis de extracto inventivo, es decir, 1 g/kg, 2 g/kg y 5 g/kg a cada 5 ratas durante 14 días y el grupo de control fue tratado con agua. Se vigiló la aparición de síntomas de toxicidad durante 4 semanas, tales como un cambio de peso, el análisis hematológico y el ensayo histológico.

Como resultado del experimento, no hubo ningún ejemplo de muerte en las ratas administradas con extracto inventivo y no se observó una anormalidad significativa en la ganancia de peso, ni en el ensayo histológico, etc. De acuerdo con los anteriores resultados, se confirmó que los extractos inventivos eran seguros.

- 5 A partir de este punto se describirán los métodos de formulación y los tipos de excipientes, pero la presente invención no está limitada por ellos. A continuación se describen ejemplos de preparación representativos.

Preparación de inyección

HF4 100 mg

Metabisulfito sódico 3,0 mg

Metil parabeno 0,8 mg

- 10 Propil parabeno 0,1 mg

Agua destilada para inyección – cantidad óptima

La preparación para inyección se preparó disolviendo el componente activo, controlando el pH hasta aproximadamente 7,5 y a continuación añadiendo todos los componentes a una ampolla de 2 mL, y esterilizando mediante un método de preparación de inyección convencional.

- 15 Preparación de polvo

HF3 500 mg

Almidón de maíz 100 mg

Lactosa 100 mg

Talco 10 mg

- 20 La preparación en polvo se preparó mezclando los anteriores componentes y llevándolos a un paquete sellado.

Preparación de comprimido

HF2 200 mg

Almidón de maíz 100 mg

Lactosa 100 mg

- 25 Estearato de magnesio – cantidad óptima

La preparación de comprimidos se preparó mezclando los anteriores componentes y empastillando.

Preparación de cápsula

HF1 100 mg

Lactosa 50 mg

- 30 Almidón de maíz 50 mg

Talco 2 mg

Estearato de magnesio – cantidad óptima.

La preparación de cápsula se preparó mezclando los anteriores componentes y llevándolos a una cápsula de gelatina mediante un método de preparación de gelatina convencional.

- 35 Preparación de líquido

HF2 1000 mg

Azúcar 20 g

Polisacárido 20 g

Aroma de limón 20 g

La preparación líquida se preparó disolviendo el componente activo, y a continuación llevando todos los componentes a una ampolla de 1000 mL y esterilizando mediante un método de preparación de líquidos convencional.

Preparación de comida saludable

- 5 HF3 1000 mg
- Mezcla de vitaminas – cantidad óptima
- Acetato de vitamina A – 70 mg
- Vitamina E 1,0 mg
- Vitamina B1 0,13 mg
- 10 Vitamina B2 0,15 mg
- Vitamina B6 0,5 mg
- Vitamina B12 0,2 mg
- Vitamina C 10 mg
- Biotina 10 mg
- 15 Amida de ácido nicotínico 1,7 mg
- Ácido fólico 50 mg
- Ácido pantoténico cálcico 0,5 mg
- Mezcla mineral – cantidad óptima
- Sulfato ferroso 1,75 mg
- 20 Óxido de zinc 0,82 mg
- Carbonato de magnesio 25,3 mg
- Fosfato de monopotasio 15 mg
- Fosfato dicálcico 55 mg
- Citrato potásico 90 mg
- 25 Carbonato cálcico 100 mg
- Cloruro de magnesio 24,8 mg

La mezcla mineral y de vitaminas mencionada antes puede variarse de múltiples formas. Dichas variaciones no deben considerarse fuera del espíritu y del alcance de la presente invención.

Preparación de bebida saludable

- 30 HF4 1000 mg
- Ácido cítrico 1000 mg
- Oligosacárido 100 g
- Concentrado de albaricoque 2 g
- Taurina 1 g
- 35 Agua destilada 900 mL

La preparación de bebida se preparó disolviendo el componente activo, mezclando, agitando a 85°C durante 1 hora, filtrando y llevando todos los componentes a una ampolla de 1000 mL, y esterilizando mediante un método convencional de preparación de bebidas saludables.

Habiéndose descrito la invención, será evidente que la misma puede variarse de múltiples formas. Dichas variaciones no deben considerarse una desviación del espíritu y del alcance de la presente invención, y todas las modificaciones obvias para el especialista en la técnica quedan incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

5 Aplicabilidad industrial

La composición de hierbas combinadas de acuerdo con la presente invención muestra un potente efecto inhibidor en el incremento del nivel de GOT, GPT, colesterol, triglicéridos, colesterol LDL, así como un efecto aumentador del nivel de colesterol HDL reducido junto con la prevención y el tratamiento de cirrosis hepática y de hígado graso.

10 Las composiciones inventivas de acuerdo con la presente invención son útiles en la prevención y en el tratamiento de las enfermedades hepáticas y se pueden usar como agentes hepato-protectores seguros y eficaces.

Listado de secuencias

SEC ID N°: 1: TGA GGG AAC CCT GAC ACT TA

SEC ID N°: 2: CTT CAA ATT TTG GGC ACT CA

LISTADO DE SECUENCIAS

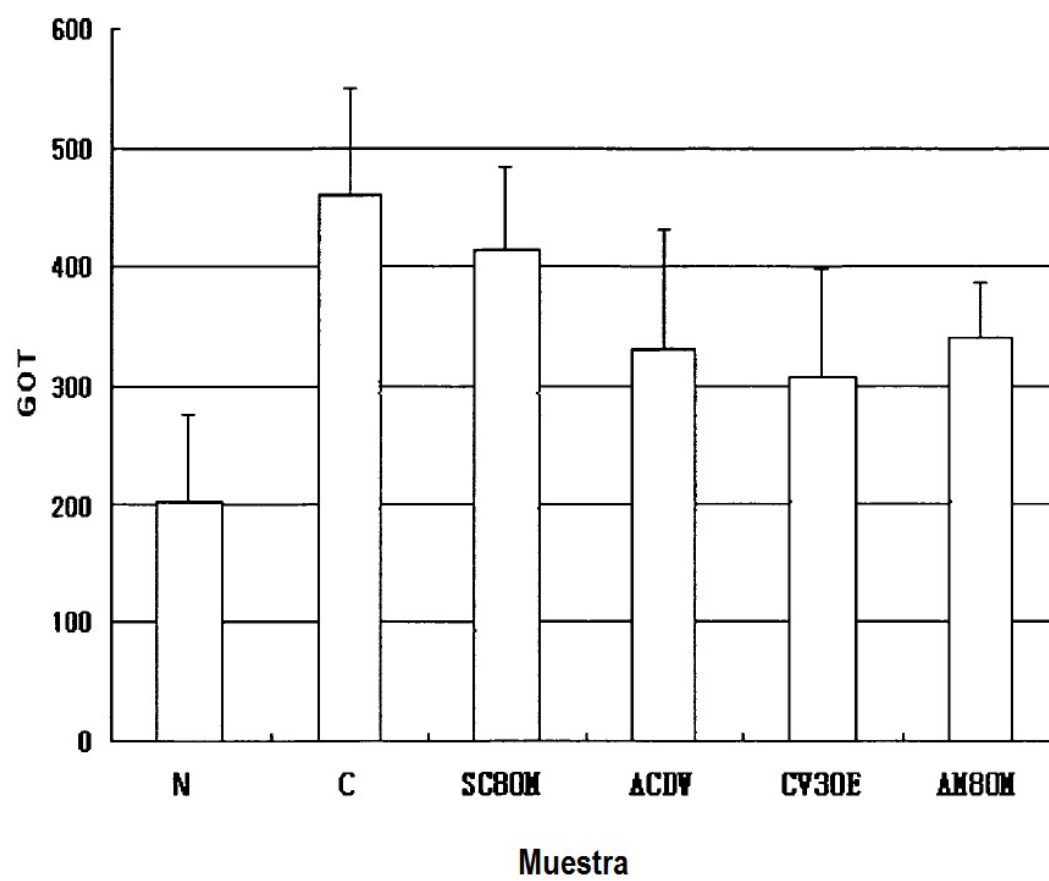
	<110> LEE, Jung Sik
5	<120> Una composición que comprende el extracto de hierbas combinadas para prevenir y tratar enfermedades hepáticas
	<130> B879EPPC
	<160> 2
	<170> PatentIn versión 3.3
10	<210> 1
	<211> 20
	<212> ADN
	<213> Artificial
	<220>
	<223> Cebador
15	<400> 1
	tgaggggaacc ctgacactta
	<210> 2
	<211> 20
20	<212> ADN
	<213> Artificial
	<220>
	<223> Cebador
	<400> 2
	cttcaaattt tgggcactca
25	

# REIVINDICACIONES

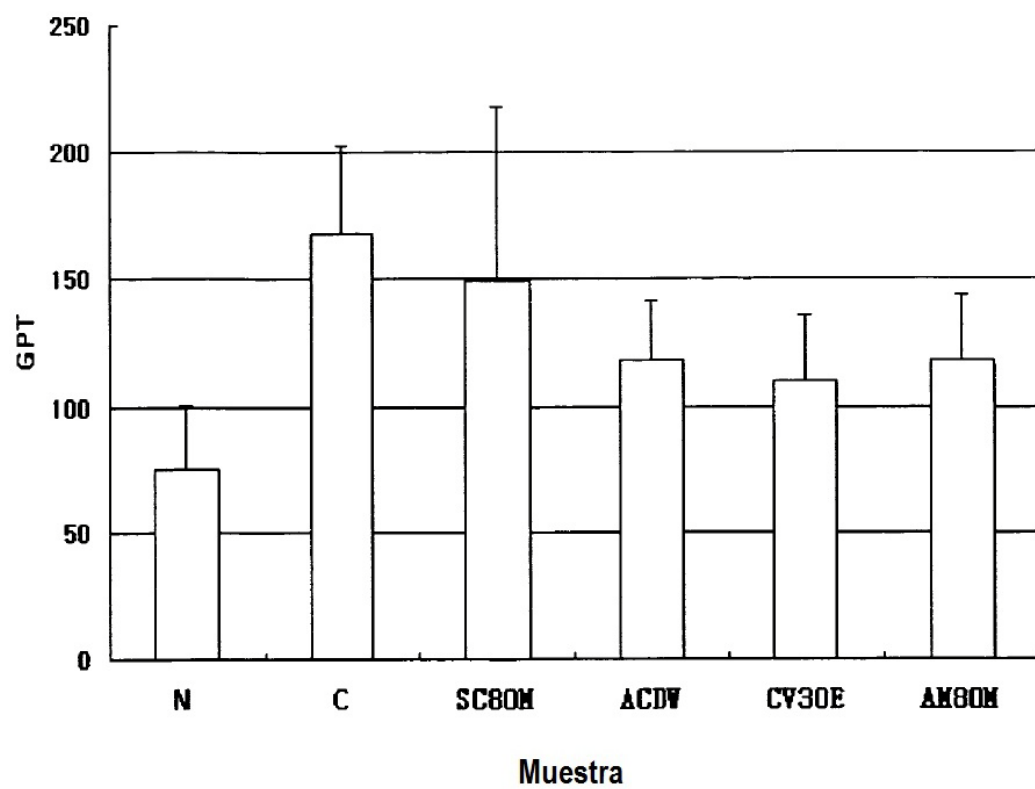
- 5 1.- Una composición farmacéutica que comprende el extracto de hierbas combinadas que consiste en *Coriolus versicolor*, *Astragalus membranaceus* Bunge, y al menos una hierba adicional seleccionada entre *Schisandra chinensis* y *Artemisia capillaris*, para uso como ingrediente activo para prevenir o tratar una enfermedad hepática.
- 2.- La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha composición farmacéutica comprende *Coriolus versicolor*, *Astragalus membranaceus* Bunge y *Schisandra chinensis* con la relación de mezcla basada en peso seco de cada hierba (% p/p) que oscila entre 0,1-10: 0,1-10: 1.
- 10 3.- La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha composición farmacéutica comprende *Coriolus versicolor*, *Astragalus membranaceus* Bunge y *Artemisia capillaris* con la relación de mezcla en base a peso seco de cada hierba (% p/p) que oscila entre 0,1-10: 0,1-10: 1.
- 15 4.- La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha composición farmacéutica comprende *Coriolus versicolor*, *Astragalus membranaceus* Bunge, *Schisandra chinensis* y *Artemisia capillaris* con la relación de mezcla en base a peso seco de cada hierba (% p/p) que oscila entre 0,1-10: 0,1-10: 0,1-10: 1.
- 5.- La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho extracto se selecciona entre extracto sin purificar, extracto de fracción insoluble en alcohol inferior o extracto soluble en disolvente no polar.
- 20 6.- La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 5, en donde dicho extracto sin purificar es el extracto soluble en agua destilada, alcoholes inferiores C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tales como metanol y etanol, o mezclas de los mismos.
- 7.- La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 5, en donde el extracto de fracción insoluble en alcohol inferior comprende el extracto obtenible mediante las etapas: extraer el extracto sin purificar con una disolución de alcoholes inferiores, como la disolución de mezcla de etanol y agua, para fraccionar en una fracción soluble en alcohol inferior y una fracción insoluble en alcohol inferior; y recolectar el extracto de fracción insoluble en alcohol inferior.
- 25 8.- La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 5, en donde el extracto soluble en disolvente no polar comprende el extracto obtenible mediante las etapas: fraccionar el extracto crudo con disolvente no polar tal como hexano, cloroformo, diclorometano o acetato de etilo; y recolectar el extracto soluble en disolvente no polar.
- 30 9.- La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha enfermedad hepática se selecciona entre hígado graso, hepatitis aguda o crónica, hepatomegalia, hepatofima, hepatocirrosis o cáncer de hígado, preferiblemente entre hígado graso, hepatocirrosis o hepatitis.
- 35 10.-Un proceso para preparar el extracto de la composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende las etapas de: lavar, secar y mezclar las hierbas establecidas en la reivindicación 1 con la relación apropiada (p/p); pulverizar las hierbas; mezclar las hierbas pulverizadas con de 5 a 20 volúmenes de agua destilada, alcoholes inferiores C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tales como metanol y etanol, o mezclas de los mismos, y macerar a una temperatura que oscila entre 0°C y temperatura ambiente durante un periodo que oscila entre 12 horas y 48 horas, o calentar de 2 a 5 veces a una temperatura entre 80 y 120°C, durante un periodo que oscila entre 1 y 24 horas; filtrar y concentrar el extracto a entre 80 y 120°C a presión reducida; concentrar mediante destilación azeotrópica con de 10 a 60 volúmenes de agua, de 1 a 5 veces y a continuación secar mediante secado por congelación o secado a vacío para obtener un extracto seco procedente de la composición de fármaco sin purificar.
- 40 11.-Un alimento funcional saludable que comprende un extracto de hierbas combinadas que consiste en *Coriolus versicolor*, *Astragalus membranaceus* Bunge y al menos una hierba adicional seleccionada entre *Schisandra chinensis* y *Artemisia capillaris*, para uso en la prevención o mejoría de una enfermedad hepática.
- 45 12.-La comida funcional saludable para uso de acuerdo con la reivindicación 11, comprendiendo dicha comida un extracto de hierbas combinadas como el definido en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8.
- 13.-La comida funcional saludable para uso de la reivindicación 11 ó 12, en donde dicha enfermedad hepática se selecciona entre hígado graso hepático, hepatitis aguda o crónica, hepatomegalia, hepatofima, hepatocirrosis o cáncer hepático, preferiblemente entre hígado graso, hepatocirrosis o hepatitis.
- 50 14.-El uso de un extracto de hierbas combinadas que comprende *Coriolus versicolor*, *Astragalus membranaceus* Bunge y al menos una hierba adicional seleccionada entre *Schisandra chinensis* y *Artemisia capillaris*, para la preparación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad hepática.

**15.-**El uso de la reivindicación 14, en donde dicha enfermedad hepática se selecciona entre hígado graso, hepatitis aguda o crónica, hepatomegalia, hepatofima, hepatocirrosis o cáncer de hígado, preferiblemente entre hígado graso, hepatocirrosis o hepatitis.

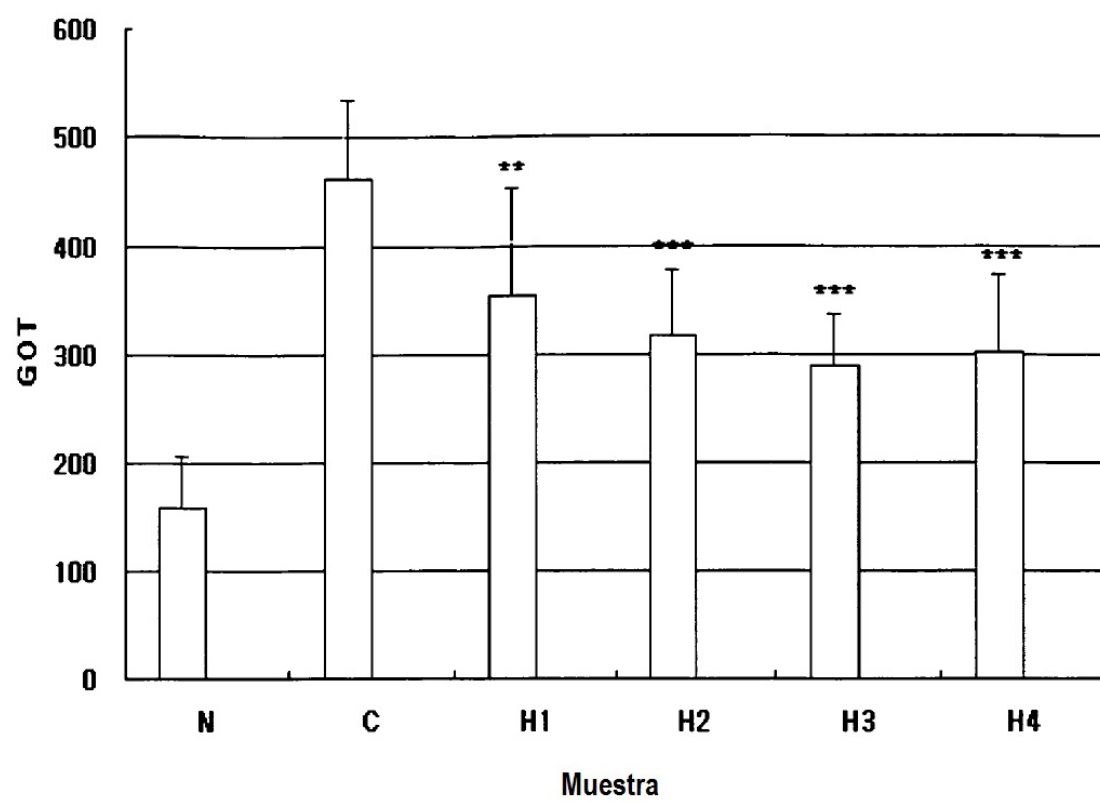
[Fig. 1]



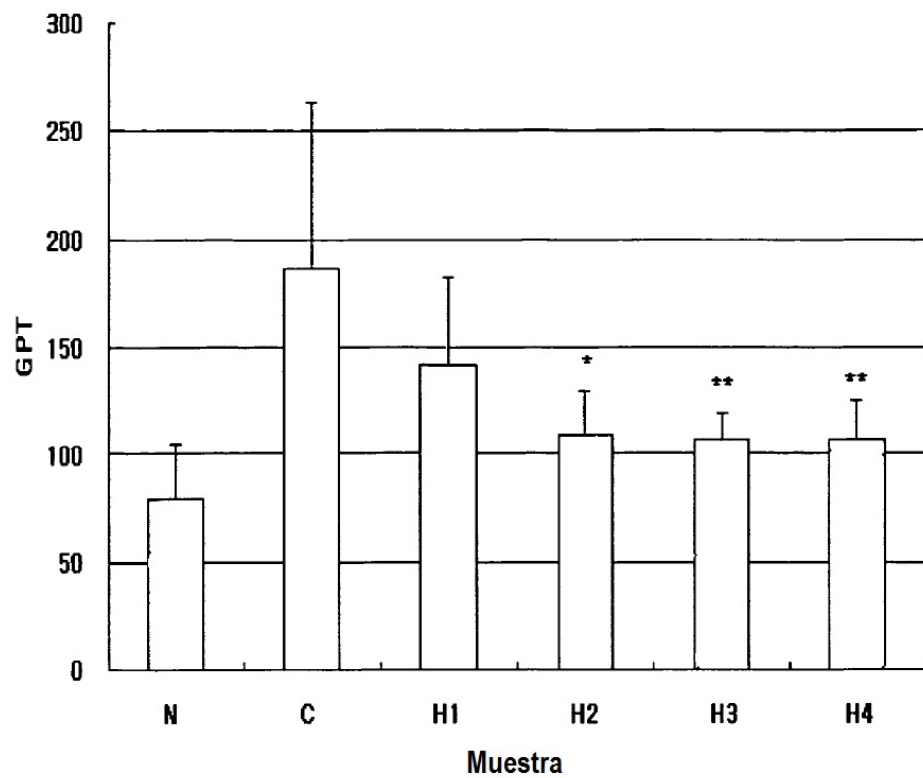
[Fig. 2]



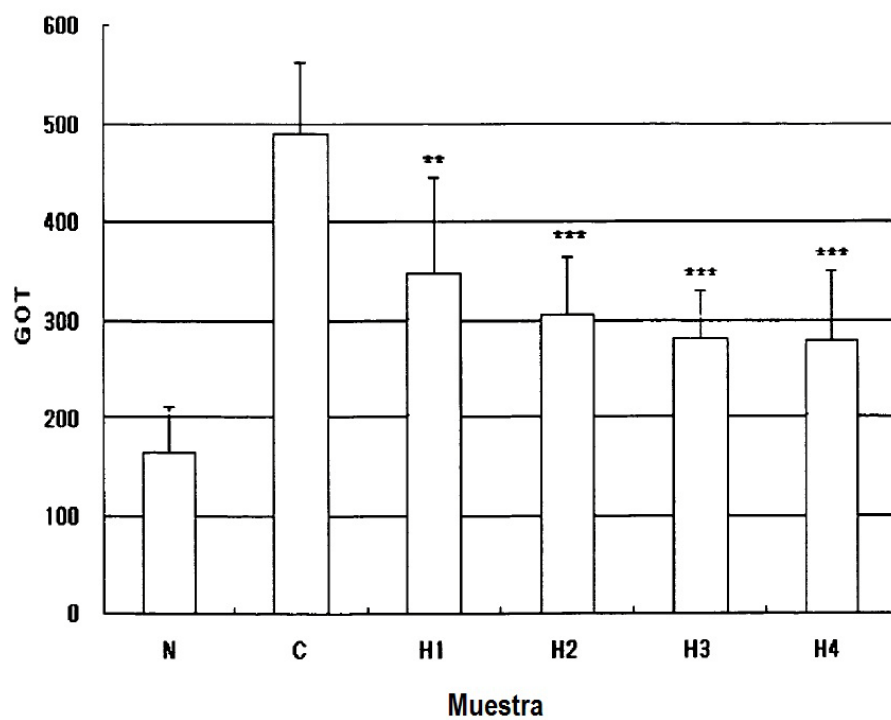
[Fig. 3]



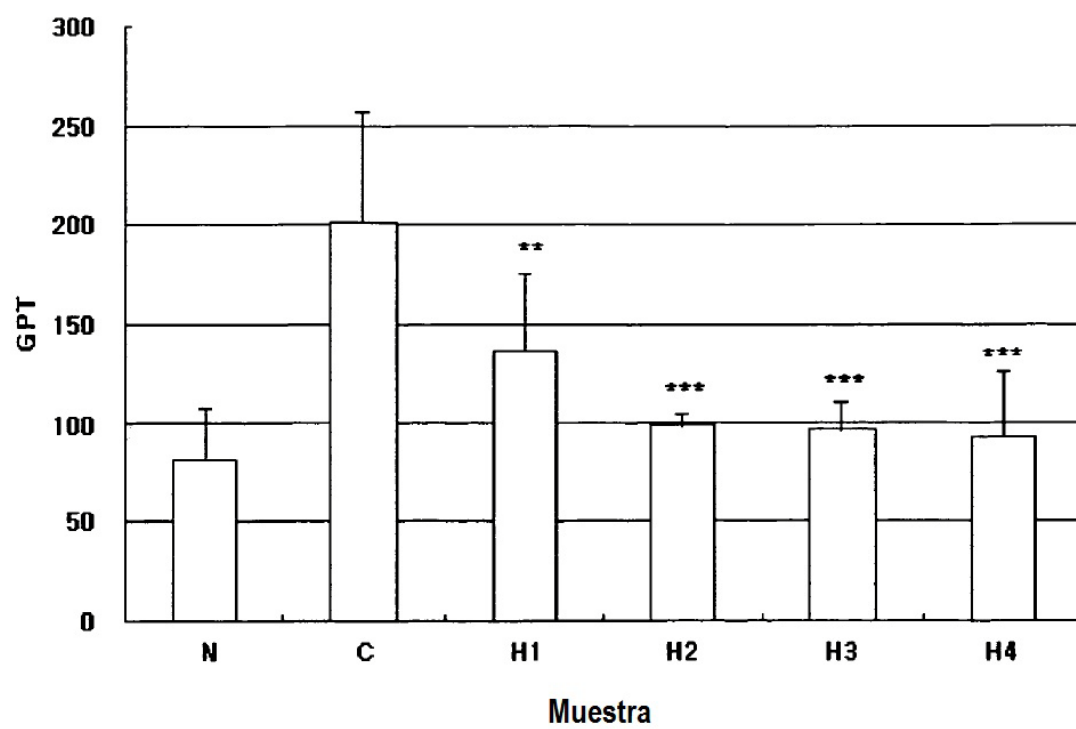
[Fig. 4]



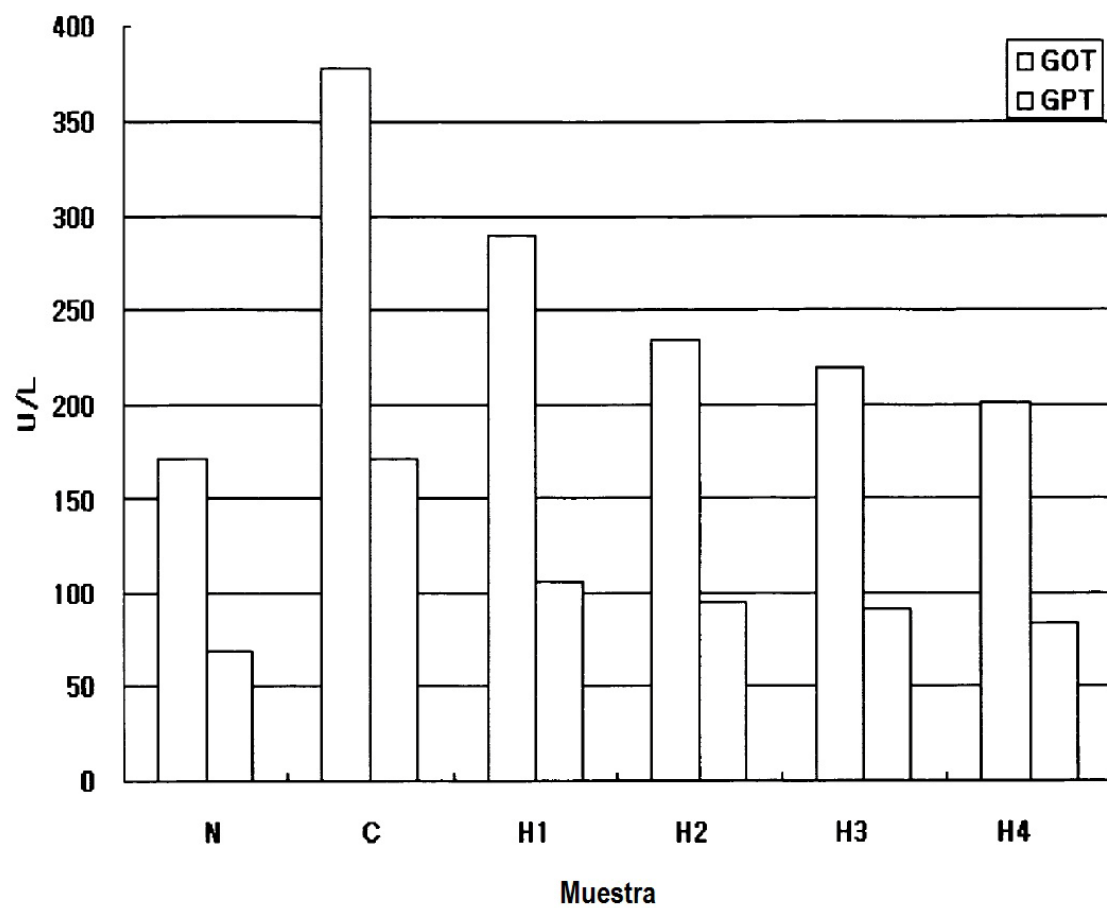
[Fig. 5]



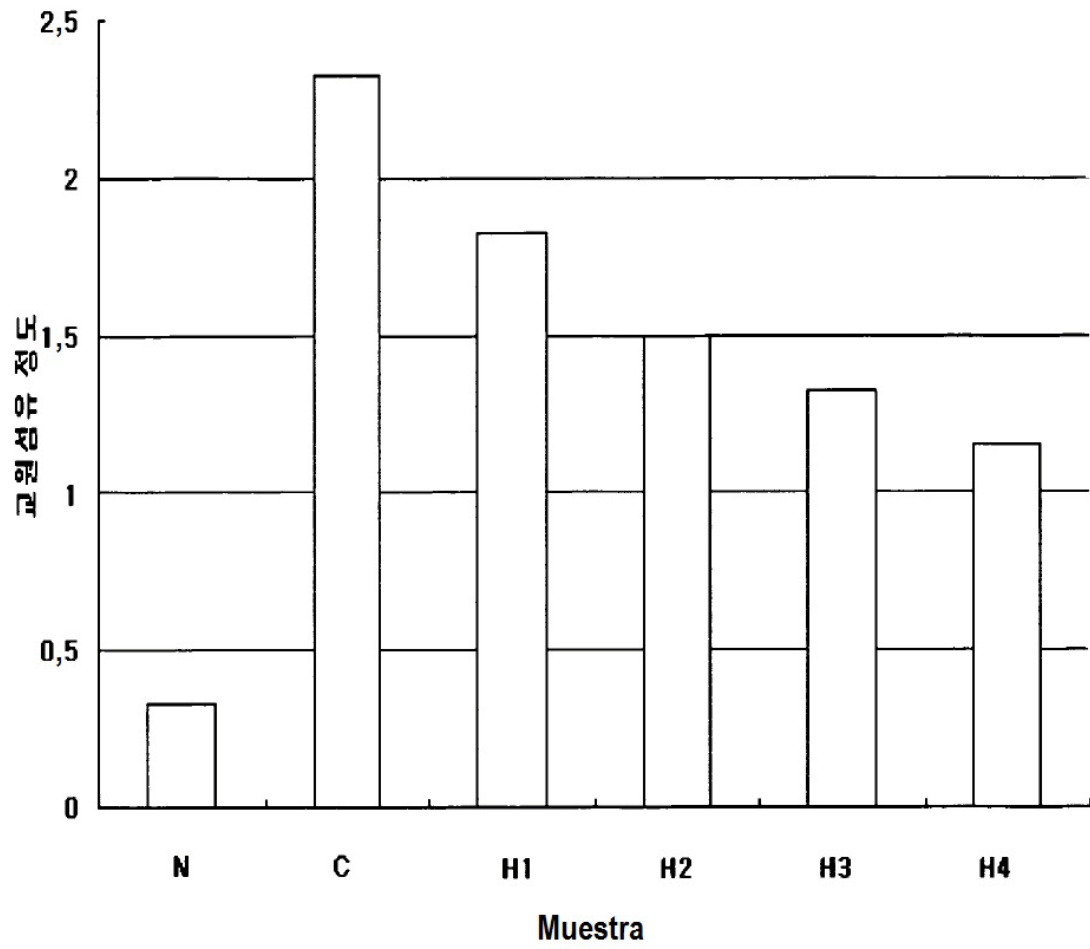
[Fig. 6]



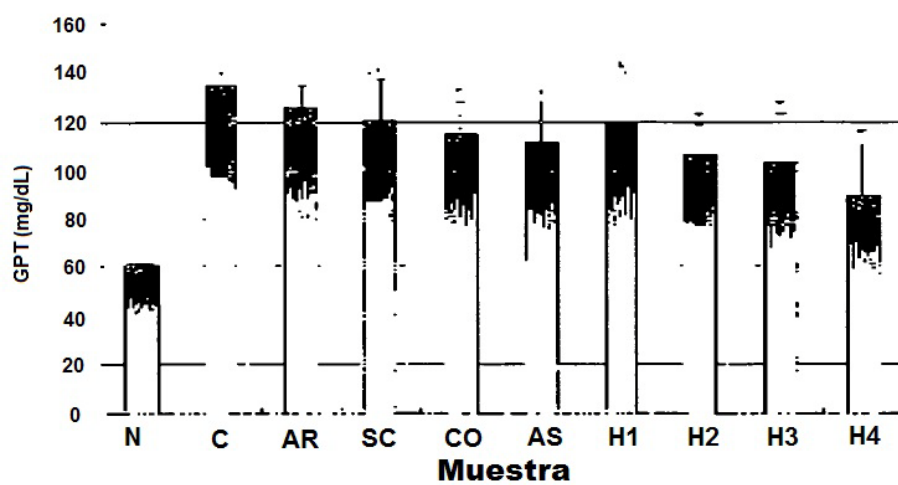
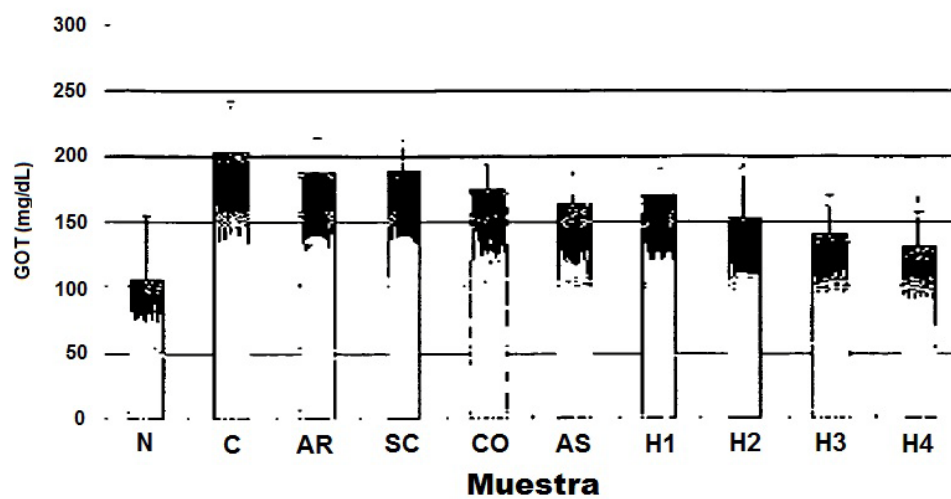
[Fig. 7]



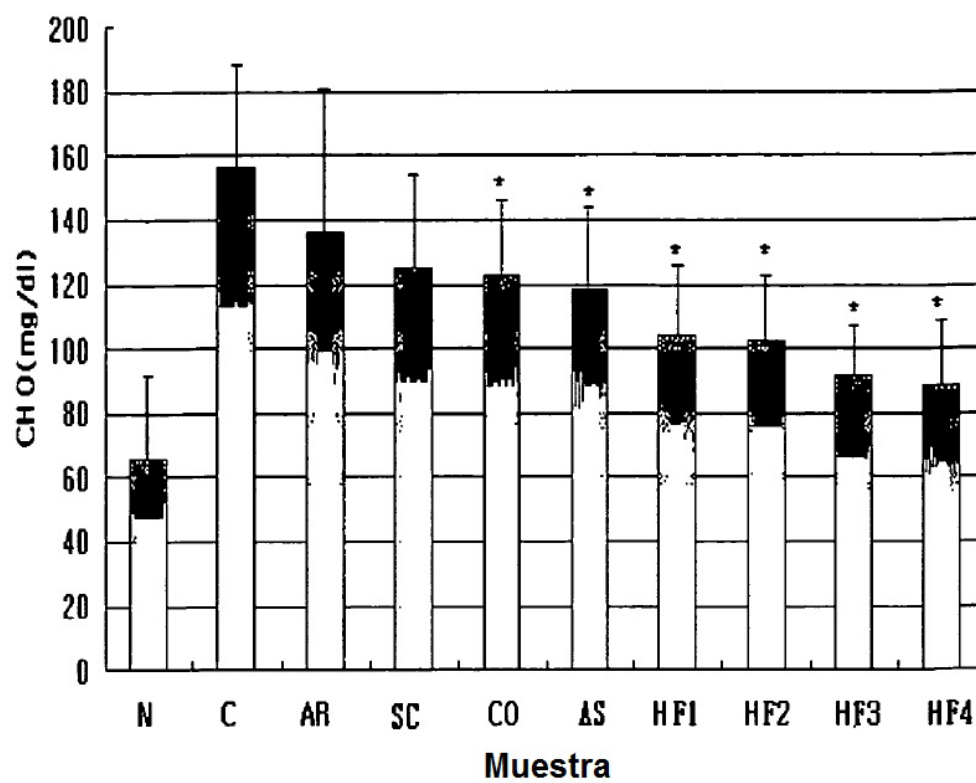
[Fig. 8]



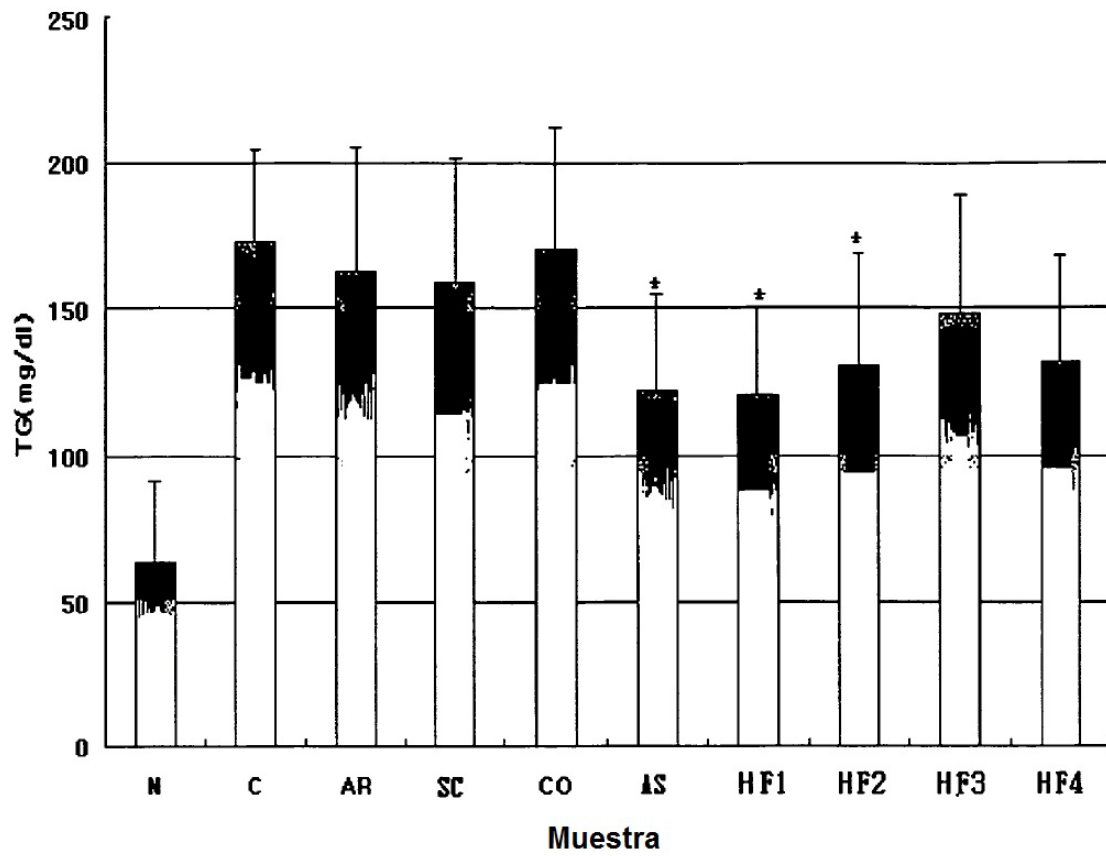
[Fig. 9]



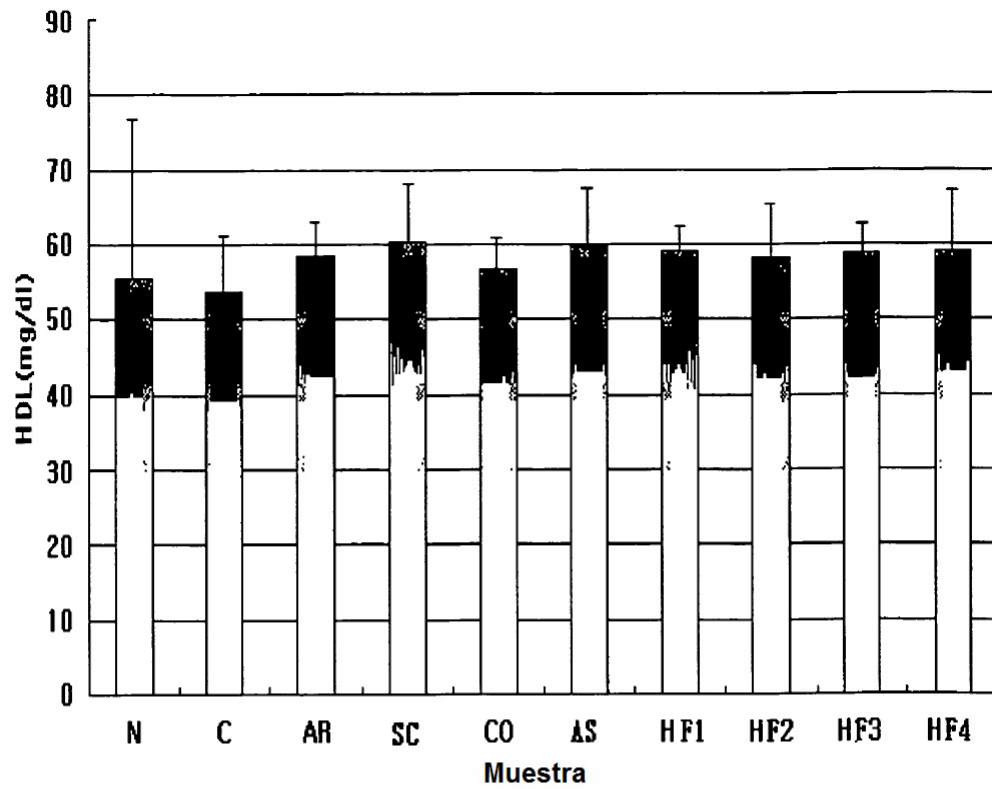
[Fig. 10]



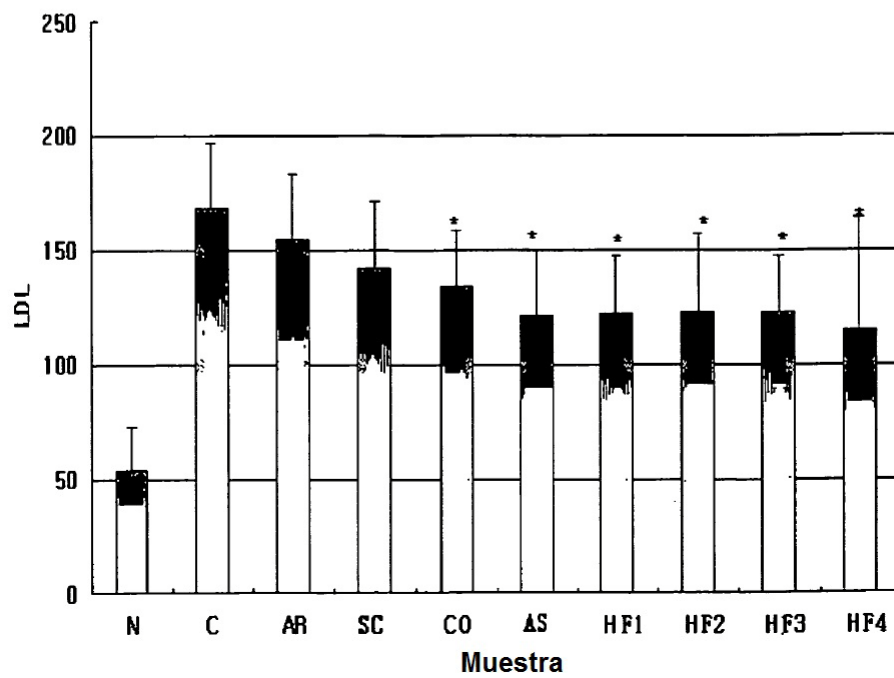
[Fig. 11]



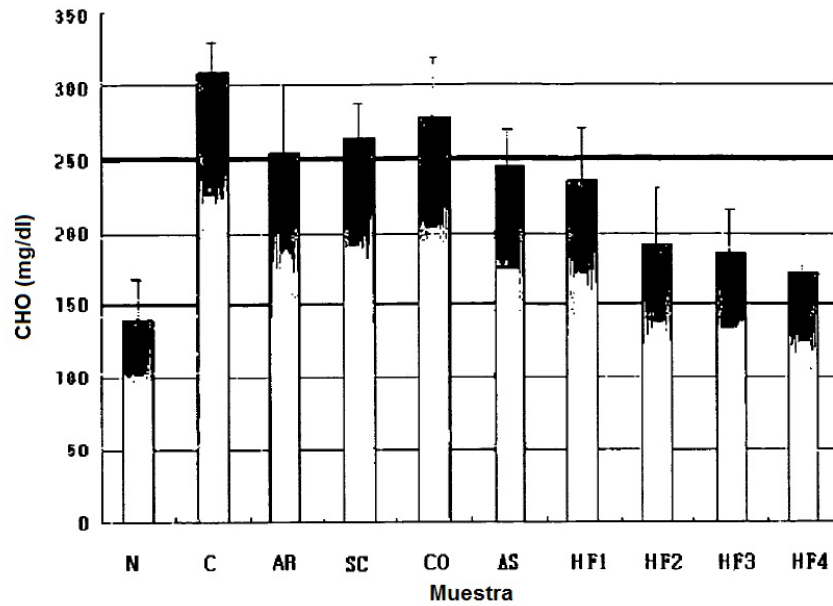
[Fig. 12]



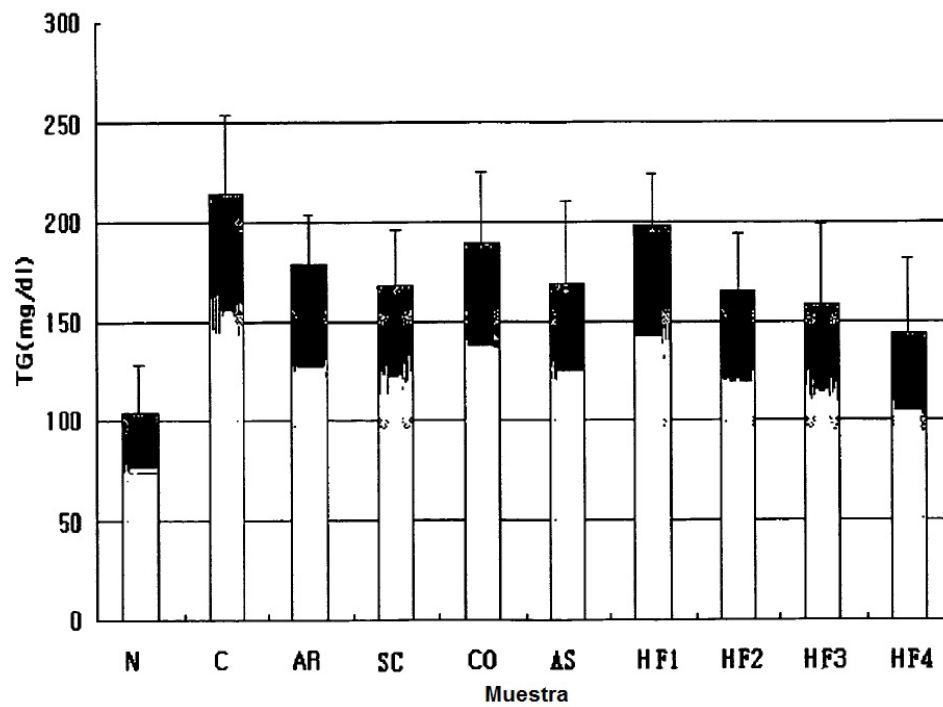
[Fig. 13]



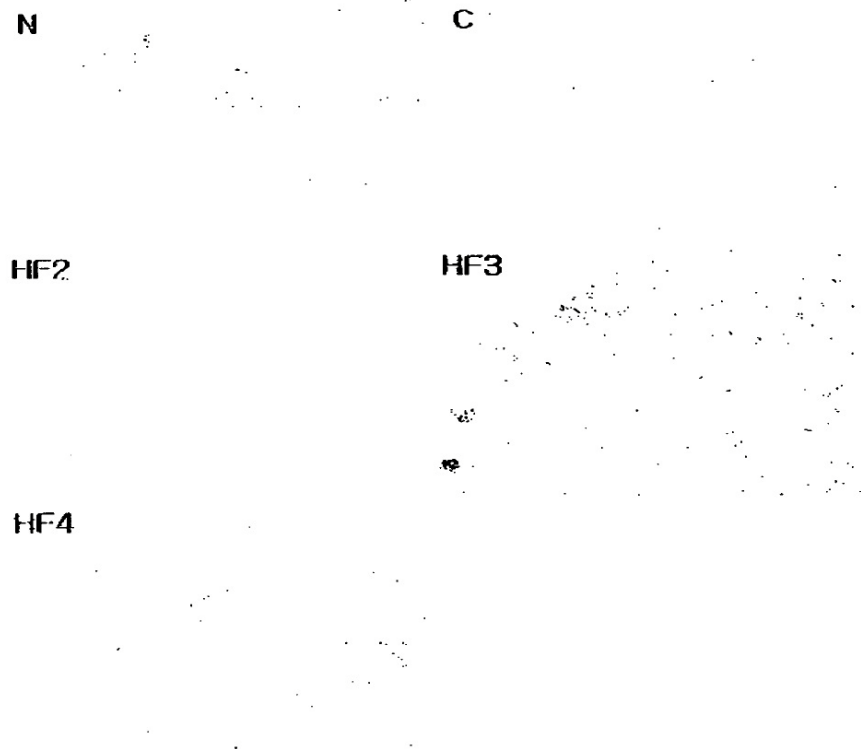
[Fig. 14]



[Fig. 15]



[Fig. 16]



[Fig. 17]

