

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 925 124**

(21) Número de solicitud: 202130278

(51) Int. Cl.:

A61K 31/357 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN

B2

(22) Fecha de presentación:

29.03.2021

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

13.10.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

19.07.2022

Fecha de concesión:

01.04.2024

(45) Fecha de publicación de la concesión:

08.04.2024

(73) Titular/es:

**FUNDACION UNIVERSITARIA SAN ANTONIO (50.0%)
CAMPUS DE LOS JERONIMOS S/N
30107 GUADALUPE (Murcia) ES y
UNIVERSIDAD DE GRANADA (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**PEREZ SANCHEZ, Horacio;
HERNANDEZ MORANTE, Juan Jose;
DEL CASTILLO SANTAELLA, Teresa;
MALDONADO VALDERRAMA, Julia y
MARTINEZ CORTES, Carlos**

(74) Agente/Representante:

DIAZ PACHECO, Maria Desamparados

(54) Título: **TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD**

(57) Resumen:

Tratamiento de la obesidad.
Silibinina para la prevención, mejora, alivio y/o
tratamiento de la obesidad, composiciones
farmacéuticas y nutracéuticas.

ES 2 925 124 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.

Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD5 **Campo de la técnica**

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina y la farmacia, y se refiere a la Silibinina para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la obesidad y de la hiperlipemia. El tratamiento con este compuesto inhibe eficazmente la lipasa pancreática, es de origen natural y ha 10 demostrado su seguridad en cuanto a la administración humana, lo que conduce a una mejoría en la salud del paciente.

Antecedentes de la invención

15

La OMS informa que el sobrepeso y la obesidad son las enfermedades más prevalentes a nivel mundial, de manera que, en 2016, el 39% de los adultos tenían sobrepeso y el 13% eran obesos. El problema del exceso de grasa corporal es que esos sujetos están más expuestos al desarrollo de enfermedades como cardiovasculares o la diabetes tipo 2; por lo tanto, la obesidad y sus 20 consecuencias siguen siendo una de las principales causas de mortalidad en el mundo. Aunque muchos factores están implicados en el desarrollo de la obesidad, un exceso de ingesta energética, especialmente en forma de grasas en la dieta, y un estilo de vida sedentario todavía se consideran factores clave para su desarrollo. En definitiva, un aporte calórico superior al gasto energético origina la acumulación de grasa corporal y, en consecuencia, la obesidad. Como resultado, la 25 ingesta de alimentos ricos en grasas y apetitosos puede hacer que los sujetos aumenten la grasa corporal. Desafortunadamente, la industria alimentaria agrega ácidos grasos en sus alimentos comerciales porque proporcionan mejores sensaciones organolépticas y gustativas para los consumidores.

30 En la actualidad, la terapia estándar para el tratamiento de la obesidad consiste en modificar los hábitos de vida, reducir el aporte energético mediante dietas hipocalóricas y aumentar el gasto energético. Desafortunadamente, la efectividad de esta intervención es bastante modesta, especialmente a largo plazo. En varias situaciones, además de la terapia convencional, se administran algunos medicamentos para reducir la ingesta calórica y mejorar el rendimiento del 35 tratamiento dietético. Hay varios medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de la

obesidad: por un lado, hay agentes de acción central como lorcaserina, fentermina/topiramato y naltrexona/bupropión, que son útiles, pero generalmente están relacionados con varios efectos adversos, que incluyen convulsiones, toxicidad por serotonina, trastornos del estado de ánimo e incluso pérdida de memoria. Por otro lado, los agentes de acción periférica como la liraglutida o el 5 orlistat también han demostrado ser agentes eficaces contra la obesidad. El orlistat es el fármaco más vendido en todo el mundo y es el único fármaco permitido en los adolescentes; su eficacia es similar a la de otros fármacos, pero es más segura ya que los efectos secundarios indeseables están relacionados con trastornos gastrointestinales como urgencia fecal, incontinencia fecal, flatos y manchado graso, que a menudo conduce a la interrupción del tratamiento. En conjunto, parece 10 evidente que la farmacoterapia más adecuada para el tratamiento de la obesidad podría ser mediante un mecanismo similar al de Orlistat, pero con mayor eficacia y menores efectos secundarios.

El mecanismo de acción del orlistat está relacionado con la inhibición parcial de la lipasa gástrica y 15 pancreática. La digestión de las grasas de la dieta se lleva a cabo mediante varias enzimas, pero depende principalmente de la acción de la lipasa pancreática. Los sustratos de la lipasa pancreática (triacilgliceroles de cadena larga) son insolubles en agua, mientras que la lipasa pancreática es soluble en agua. De esta manera, la lipasa pancreática se adsorbe en la interfaz aceite-agua de las 20 gotitas de la emulsión para hidrolizar el triacilglicerol en ácidos grasos libres (FFA) y monoglicéridos, que luego serán absorbidos en el intestino delgado. Por lo tanto, la lipólisis ocurre en la interfaz aceite-agua de los sustratos emulsionados y, como consecuencia, la estructura y composición de la 25 interfaz es esencial para la actividad de la lipasa pancreática. La reacción de lipólisis comprende varios fenómenos que ocurren en la interfaz aceite-agua. La inhibición de la acción de la lipasa puede originarse por adsorción, cambios conformacionales, procesos enzimáticos y/o desorción de los 30 productos de la lipólisis. Los inhibidores potenciales de la lipasa con propiedades tensioactivas podrían competir por la interfaz aceite-agua impidiendo la actividad de la lipasa. La presencia de productos lipolíticos en la interfaz también evita un mayor acceso de lipasa. Las interacciones masivas que atrapan la lipasa pueden alterar su conformación o inhibir el sitio activo a través de 35 interacciones específicas. Los inhibidores también pueden desnaturalizar la lipasa, reduciendo su actividad enzimática o su actividad interfacial. Por lo tanto, la eficacia de los inhibidores comerciales depende en última instancia de las propiedades de la interfaz aceite-agua y del comportamiento interfacial de la lipasa. La inhibición de la lipólisis y los eventos específicos que tienen lugar en la interfaz se pueden evaluar rápidamente al monitorear los cambios en la tensión interfacial de las interfaces aisladas como se describió anteriormente. Esto se puede verificar posteriormente con 35 estudios de microestructura de emulsión que permitan cuantificar la inhibición de una manera más realista.

Descripción de las figuras

Figura 1. Las estructuras químicas de a) Silibinina (A), b) Orlistat (Xenical®) y c) Quercetina. Se 5 utilizó el software ACD / ChemSketch.

Figura 2. Representación 3D de los resultados del acoplamiento molecular de Orlistat (a), y Silibinina (A) (c) con lipasa pancreática (Protein Data Bank: 1lpb). Los enlaces de hidrógeno se muestran en rojo, las interacciones hidrofóbicas en violeta, los puentes de sal en amarillo y la 10 interacción de apilamiento de pi en verde. Los residuos relevantes dentro del centro catalítico se muestran como barras delgadas de color amarillo. Otros residuos que interactúan con los compuestos se muestran como líneas naranjas.

Figura 3. Tensión interfacial y elasticidad dilatacional interfacial obtenida después de 1 h de 15 adsorción manteniendo el área interfacial constante en la interfaz aceite de oliva-agua en tampón duodenal. Lipasa (azul), Lipasa + Orlistat (rojo) y Lipasa + Silibinina (A) (verde). Concentraciones: lipasa (1,6 g/l), orlistat (0,22 g/l), o silibinina (A) (0,88 g/l). Los valores representados son valores medios de tres medidas independientes y las desviaciones estándar se representan como barras de error según la herramienta estadística. Luego, los valores medios se compararon mediante la 20 prueba de Tukey. Se asignaron letras diferentes a valores con diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 4. Dependencia temporal de la liberación de ácidos grasos (%) de las emulsiones O/W de 25 aceite de oliva estabilizadas con Tween 20, después de añadir lipasa y sales biliares ($T = 37^\circ\text{C}$). Se realizaron al menos tres medidas. AUC de lipasa, lipasa-orlistat. Se utilizaron lipasa (1,6 g/l), orlistat (0,22 g/l) o silibinina (A) (0,88 g/l) concentraciones finales.

Descripción de la invención

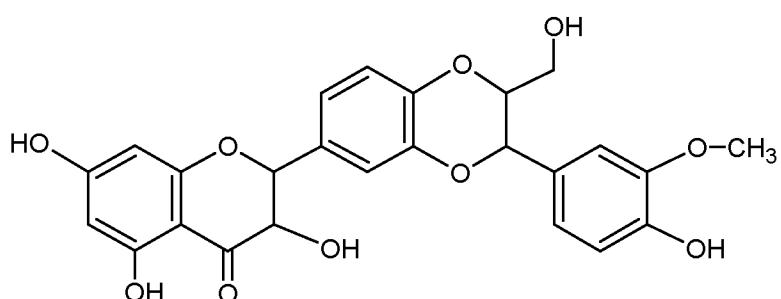
En la presente invención, la silibinina (A) se seleccionó mediante ensayos virtuales masivos de 30 detección y acoplamiento. La silibinina (A) es un flavonolignano extraído del cardo mariano (*Onopordum acanthium*).

Los autores de la presente invención han evaluado la inhibición de la lipasa pancreática mediante 35 una evaluación rápida interfacial (Del Castillo-Santaella *et al.*, 2015. *Journal of Agricultural and Food*

Chemistry, 63(47), 10333–10340). Esta inhibición se validó, además, mediante la cuantificación del porcentaje de FFA tras la lipólisis de un modelo de emulsión, que confirmó los resultados.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica
5 que comprende

- orlistat y
- un compuesto de fórmula general (I) o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, ésteres, tautómeros, isómeros, solvatos o hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones,



Fórmula (I)

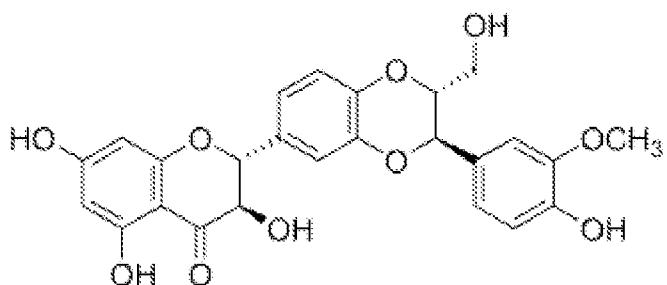
para su uso en la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la obesidad.

15

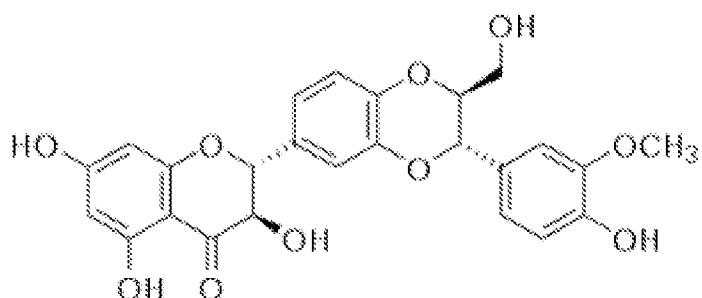
El compuesto de fórmula (I) es la silibinina también conocida como silibina, es el principal constituyente activo de la silimarina, un extracto estandarizado de las semillas de cardo mariano,
20 que contiene una mezcla de flavonolignanos, que incluye silibinina, isosilibinina, silicristina, silidianina, y otras. La Silibinina en sí misma es una mezcla de dos diastereoisómeros, silibina A y silibina B, en una relación aproximadamente equimolar. El número CAS: 22888-70-6

La fórmula IIA representa la Silibinina A (Silibina A o Silimarina I), y la fórmula IIB la Silibinina B.

25



Fórmula (II A)



5 Fórmula (II B)

Más preferiblemente el compuesto de fórmula general (I) es la Sillibinina A.

- 10 La digestión de las grasas (triglicéridos) ingeridas con los alimentos se efectúa en el intestino principalmente por la lipasa del páncreas. La lipasa del páncreas escinde los enlaces éster primarios de los triglicéridos, dando lugar a los ácidos grasos libres y los 2-monoglicéridos como productos de reacción. Estos productos pueden luego reabsorberse y utilizarse. Al inhibir la lipasa del páncreas, se previene parcialmente la escisión antes mencionada de las grasas que provienen de la
 15 dieta y con ello también la reabsorción y utilización de estas grasas; de esta manera los triglicéridos se excretan a través del tracto digestivo.

Por tanto, este aspecto de la invención también se refiere a un compuesto de fórmula general (I) o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tau-
 20 tómeros, isómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la hiperlipemia.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define como obesidad cuando el índice de masa corporal (IMC, cociente entre el peso y la estatura de un individuo al cuadrado) es igual o superior a 30
5 kg/m². También se considera signo de obesidad un perímetro abdominal en hombres mayor o igual a 102 cm y en mujeres mayor o igual a 88 cm.

La hiperlipidemia, hiperlipidosis o hiperlipemia consiste en la presencia de niveles elevados de los lípidos en la sangre. No puede considerarse una patología sino un desajuste metabólico que puede
10 ser secundario a muchas enfermedades y puede contribuir a muchas formas de enfermedad, especialmente cardiovasculares.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros,
15 dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de estos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de estos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.
20

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término "prodroga" o "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye cualquier derivado de un compuesto de fórmula (I) -por ejemplo y no limitativamente: ésteres (incluyendo ésteres
25 de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc.), carbamatos, amidas, etc.- que al ser administrado a un individuo puede ser transformado directa o indirectamente en dicho compuesto de fórmula (I) en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de
30 fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

35 Tal como aquí se utiliza, el término "derivado" incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración

de un medicamento o composiciones alimentarias, como derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables. Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término "solvato", tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

20

Más preferiblemente se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, isómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso en la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la obesidad.

También se refiere a una composición que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I), para su uso en la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la hiperlipidemia.

Este aspecto de la invención también se refiere a una composición farmacéutica, que comprende al menos un compuesto de la invención, o un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, un derivado o un profármaco de este, para su uso en la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la hiperlipidemia.

35

- En una realización preferida de este aspecto, la composición además comprende un transportador o carrier farmacéuticamente aceptable, un excipiente o un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la composición farmacéutica de la invención solo comprende como principio activo un compuesto de fórmula general (I) o cualquiera de sus sales, preferiblemente 5 cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, isómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones. No obstante, puede comprender vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 10 Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.
- El término "excipiente" se refiere a componentes de un compuesto farmacológico distintos del ingrediente activo (definición obtenida de la Agencia Europea de Medicamentos - EMA). Preferiblemente incluyen un "portador, adyuvante y/o vehículo. Los portadores son formas a las que se incorporan sustancias para mejorar la administración y la eficacia de los fármacos. Los portadores de 15 fármacos se utilizan en sistemas de administración de fármacos, como la tecnología de liberación controlada, para prolongar las acciones del fármaco *in vivo*, disminuir el metabolismo del fármaco o 20 reducir la toxicidad del fármaco. Los vehículos también se utilizan para aumentar la eficacia de la administración de fármacos a los sitios diana de acción farmacológica. El adyuvante es una sustancia que se agrega a la formulación de un medicamento y que afecta la acción del ingrediente activo de una manera predecible.
- 25 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo 30 la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales, profármacos y/o solvatos, así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos 35 adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no

a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato de este.

- Puede usarse cualquier método apropiado para identificar a un mamífero con sobrepeso (por ejemplo, obeso). En algunos casos, calcular el índice de masa corporal (IMC), medir la circunferencia de la cintura y/o la cadera, el historial de salud (p.ej. historial de peso, esfuerzos para bajar de peso, hábitos de ejercicio, hábitos alimenticios, otras afecciones médicas, medicamentos, niveles de estrés y/o antecedentes de salud familiar), examen físico (p. ej., medir su altura, controlar los signos vitales como la frecuencia cardíaca, la presión arterial, escuchar su corazón y pulmones y examinar su abdomen), determinar el porcentaje de grasa corporal y su distribución, porcentaje de grasa visceral y en órganos, el síndrome metabólico y/ o las comorbilidades relacionadas con la obesidad pueden usarse para identificar mamíferos (por ejemplo, humanos) como obesos. Preferiblemente se emplea el porcentaje de grasa corporal.
- Una vez identificado como obeso, se puede evaluar a un mamífero para determinar si es probable que responda o no a una o más intervenciones (p. ej., Intervención farmacológica, intervención quirúrgica, dispositivo para adelgazar, intervención dietética, intervención conductual y/o intervención del microbioma). La intervención puede ser farmacológica, y puede emplearse el compuesto de la presente invención junto con otros principios activos para el tratamiento de la obesidad.

20

- Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" o "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.
- Otro aspecto de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende el compuesto de la invención o la composición de la invención, para su uso en la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la obesidad.

En esta memoria se entiende por "forma farmacéutica" la mezcla de uno o más principios activos con o sin aditivos que presentan características físicas para su adecuada dosificación, conservación, administración y biodisponibilidad.

- 5 La composición farmacéutica según la presente invención puede estar en cualquier forma adecuada para su aplicación en seres humanos y/o animales, preferiblemente humanos, incluyendo bebés, niños y adultos, y se puede producir por medio de métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, los descritos o mencionados en las farmacopeas española y estadounidense y textos de referencia similares. Los ejemplos de formas de dosificación comunes son
- 10 formas de dosificación sólidas (tabletas, píldoras, cápsulas, etc.) o formas de dosificación líquidas (soluciones, suspensiones o emulsiones).

Por tanto, la administración de los compuestos de la presente invención puede ser intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intravenosa, intraarterial, intravesical, intraósea, intracavernosa, pul-
15 monar, bucal, sublingual, ocular, intravítreo, intranasal, percutánea, rectal, vaginal. , administración oral, epidural, intratecal, intraventricular, intracerebral, intracerebroventricular, intracisternal, intra-espinal, periespinal, intracraneal, mediante agujas o catéteres con o sin dispositivos de bomba, administración tópica, particularmente dérmica, transdérmica o subcutánea, u otras vías de aplicación del mismo.

20

En otra realización preferida de la presente invención, las composiciones y formas farmacéuticas de la invención son adecuadas para la administración oral, en forma sólida o líquida. Las posibles formas para la administración oral son tabletas, cápsulas, siropes o soluciones y pueden contener excipientes convencionales conocidos en el ámbito farmacéutico, como agentes agregantes (p.e. 25 sirope, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinil pirrolidona), rellenos (p.e. lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina), disgregantes (p.e. almidón, polivinil pirrolidona o celulosa microcristalina) o un surfactante farmacéuticamente aceptable como el lauril sulfato de sodio. Otras formas farmacéuticas pueden ser los sistemas coloidales, dentro de los cuales se incluyen nanoemulsiones, nanocápsulas y nanopartículas poliméricas.

30

Las composiciones para administración oral pueden ser preparadas por métodos los convencionales de Farmacia Galénica, como mezcla y dispersión. Las tabletas se pueden recubrir siguiendo métodos conocidos en la industria farmacéutica.

35 Las composiciones y formas farmacéuticas se pueden adaptar para la administración parenteral, como soluciones estériles, suspensiones, o liofilizados de los productos de la invención, empleando

la dosis adecuada. Se pueden emplear excipientes adecuados, como agentes tamponadores del pH o surfactantes.

Las formulaciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia.

5 El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales.

10 La administración de los compuestos, composiciones o formas farmacéuticas de la presente invención puede ser realizada mediante cualquier método adecuado, como la infusión intravenosa y las vías oral, tópica o parenteral. La administración oral es la preferida por la conveniencia de los pacientes y por el carácter crónico de las enfermedades a tratar.

15 La cantidad administrada de un compuesto de la presente invención dependerá de la relativa eficacia del compuesto elegido, la severidad de la enfermedad a tratar y el peso del paciente. Sin embargo, los compuestos de esta invención serán administrados una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 veces diarias, con una dosis total entre 0.1 y 1000 mg/Kg/día. Es importante tener en cuenta que puede ser necesario introducir variaciones en la dosis, dependiendo de la edad y de la 20 condición del paciente, así como modificaciones en la vía de administración.

25 Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

Composición alimentaria de la invención.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una composición alimentaria tal y como una composición nutracéutica o una composición del tipo "*medical food*", de ahora en adelante composición alimentaria de la invención, que comprende al menos un compuesto o una composición de la invención, para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la obesidad.

También se refiere a la composición alimentaria de la invención, que comprende al menos un compuesto o una composición de la invención, para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la hiperlipidemia.

- 5 La composición alimentaria de la invención comprende el compuesto de la invención en una cantidad eficaz para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la obesidad, en mamíferos, incluyendo un ser humano. Las composiciones alimentarias preferidas se seleccionan de la lista que consiste en: una bebida, leche, yogur, queso, leche fermentada, bebida de leche aromatizada, leche de soja, cereales precocinados, pan, pasteles, mantequilla, margarina, salsas, aceites para 10 freír, aceites vegetales, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de palma, aceite de girasol, aceite de semilla de algodón, condimentos, aderezos para ensaladas, zumos de frutas, jarabes, postres, glaseados y rellenos, productos congelados blandos, dulces, chicles y alimentos intermedios. La composición alimentaria de la invención puede ser un suplemento nutricional o dietético. En otra realización preferida, el suplemento nutricional o dietético comprende una composición 15 estéril que contiene el compuesto de la invención, preferentemente provisto de un revestimiento resistente a los ácidos gástricos, siendo una composición de liberación retardada. En otra realización preferida, la composición alimentaria, incluyendo el compuesto de la invención y/o el suplemento nutricional o dietético comprende "portadores" apropiados tales como diluyentes, adyuvantes, excipientes o vehículos con los que se administra el compuesto de la invención. Excipientes 20 apropiados adecuados incluyen, pero no se limitan a almidón, glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, sulfato de calcio, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, y similares. Tales suplementos nutricionales se pueden utilizar para combatir problemas hepáticos, y ayudan a mantener la salud o un estilo de vida saludable al mamífero, preferiblemente un ser 25 humano.

El término "tratamiento" tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- 30 (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
(ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
(iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.
- 35 El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un

sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En la práctica de la presente invención se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción o se pueden aprender mediante la práctica de la invención.

EJEMPLOS DE LA INVENCIÓN

15

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

MATERIAL Y MÉTODOS

20

Materiales

Lipasa de proteína de páncreas porcino (Tipo II, 100-400 unidades/mg) comprada a Sigma-Aldrich® (cat n. L3126), almacenada a 4°C siguiendo las instrucciones del fabricante. La silibinina (A) se adquirió de Sigma (S0417) y se almacenó a -18°C. La tributirina se adquirió de Sigma-Aldrich® (W222305) y se almacenó a temperatura ambiente. El aceite de oliva altamente refinado (Sigma-Aldrich®, cat n. 01514) se purificó con resinas Florisil® (Fluka, malla 60-10, cat n. 46385) antes de ser utilizado siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Del Castillo-Santaella et al., 2015. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(47), 10333–10340; Maldonado-Valderrama et al., 30 2015. *Advances in Colloid and Interface Science*, 222. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.08.002>).

El tampón de titulación se preparó en 14,5 ml de TRIS-hidroximetil-aminometano (36 mg/l), NaCl (9000 mg/l), CaCl₂ (200 mg/l), taurodesoxicolato de sodio (2080 mg/l) y se almacenó a 4°C. El tampón duodenal se preparó en BIS-TRIS 2 mM (Sigma-Aldrich®, 14879), NaCl 0,15 M, CaCl₂ 0,002 M, pH 7,0, de acuerdo con el método estandarizado de digestión in vitro para alimentos (Minekus et

al., 2014. *Food & Function*, 5(6), 1113–1124). Se prepararon muestras de lipasa (7,8 g/l) inmediatamente antes de su uso en el tampón duodenal con sales biliares (5 mg/ml) para microbiología (Sigma-Aldrich®, B8756). Se agregaron inhibidores a esta mezcla y se filtraron antes de su uso con filtros Millex® (0.1 µm PDVF).

5

La concentración de orlistat se fijó en 0,22 g/l en metanol (concentraciones finales al 5,2%). Se disolvió silibinina (A) en acetona. Se probó a una concentración de 0.88 g/l relevante para estudios fisiológicos (Del Castillo-Santaella et al., 2015. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(47), 10333–10340).

10

Para la preparación de las soluciones tampón se utilizó agua ultrapura, limpiada con un sistema de purificación de agua Milli-Q (0,054 µS). Todo el material de vidrio se lavó con solución de limpieza Micro-90 al 10% y se enjuagó exhaustivamente con agua del grifo, isopropanol, agua desionizada y agua ultrapura en esta secuencia. Todos los demás productos químicos utilizados fueron de grado 15 analítico y se utilizaron tal como se recibieron.

Proyección virtual

El primer paso para llevar a cabo este objetivo fue la selección de una base de datos de compuestos 20 adecuada para realizar un análisis de cribado virtual. En este sentido, la última versión de DrugBank (versión 5.1.4), que contiene 13.574 entradas de medicamentos, incluidos 2.632 medicamentos de molécula pequeña aprobados, 1.377 productos biológicos aprobados (proteínas, péptidos, vacunas y alergénicos), 131 nutracéuticos, y más de 6.375 fármacos experimentales (fase de descubrimiento), lo que permitió una búsqueda exhaustiva de posibles compuestos inhibidores de la lipasa, 25 con la ventaja de que ya se han probado (o se están probando) en humanos, por lo que se podrían probar para su uso en humanos más rápidamente (Wishart et al., 2017. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D1074–D1082). Más importante aún, esta base de datos se ha utilizado con éxito para la reutilización de medicamentos para enfermedades huérfanas (Govindaraj et al., 2018. *Npj Systems Biology and Applications*, 4(1), 13), lo que confirma la idoneidad de este procedimiento.

30

Todos los compuestos depositados en DrugBank se configuraron para simulaciones de acoplamiento mediante el uso de AmberTools (AMBER 2017, Universidad de California, San Francisco) (Case et al., 2017. AMBER 2017, University of California, San Francisc. <https://doi.org/citeulike-article-id:2734527>). Los parámetros moleculares se calcularon eliminando sales y neutralizando su

estado de protonación, calculando cargas parciales por campo de fuerza MMFF94, agregando átomos de hidrógeno y minimizando energías (parámetros por defecto) (Halgren, 1995. *Current Opinion in Structural Biology*, 5(2), 205–210).

- 5 La estructura cristalina de la lipasa pancreática (código del banco de datos de proteínas 1LPB) se utilizó para construir el sistema de modelo de proteínas (Egloff *et al.*, 1995. *Biochemistry*, 34, 2751–2762). En una etapa temprana, se asignaron órdenes de enlace, se agregaron hidrógenos y se incluyeron las cabezas terminales con el módulo *Protein Preparation Wizard* como se implementa en Maestro (Schrödinger Release 2019-4: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, USA) (Madhavi
10 Sastry *et al.*, 2013. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27(3), 221–234). Los estados de protonación de todas las cadenas laterales se definieron posteriormente utilizando PROPKA3.1. Las cargas parciales sobre todos los átomos finalmente se asignaron dentro del esquema de campo de fuerza AMBER99 implementado en AmberTools. Las simulaciones de acoplamiento se realizaron con el software Lead Finder v1.1.20 (Stroganov *et al.*, 2008. *Journal of Chemical Information and
15 Modeling*, 48(12), 2371–2385). Todos los parámetros de acoplamiento se establecieron por defecto para los cálculos. La puntuación de acoplamiento mejor clasificada planteada para cada compuesto se retuvo para un análisis adicional.

Actividad de la lipasa pancreática

20

El método pHStat

Este método se llevó a cabo para evaluar la actividad de la lipasa pancreática utilizando tributirina como sustrato y tampón de titulación. Los ácidos grasos libres liberados por la lipasa se valoraron
25 a un pH constante de 8,0 mediante perfusión de hidróxido de sodio (NaOH, 0,01 N) y 37°C. Se mezclaron 0,5 ml de tributirina con el tampón de titulación descrito anteriormente (Carriere *et al.*, 1993. *Gastroenterology*. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(93\)90908-U](https://doi.org/10.1016/0016-5085(93)90908-U)). También se añadió lipasa pancreática porcina a 50 µg. Los inhibidores utilizados en este método fueron: orlistat (1.393 µg, 0.2 g/l) y silibinina (A) (5.573 µg, 0.88 g/l).

30

El experimento se basa en medir la actividad de la lipasa sola y en coadministración con los inhibidores potenciales y determinar el volumen de NaOH necesario para mantener un pH constante de 8,0, en cada caso. Luego, la actividad enzimática (U / mg en peso seco) se calcula por la ecuación 1.

35

$$\frac{\text{Units}}{\text{mg powder}} = \frac{R(\text{NaOH}) \times 1000}{v \times [E]} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde, R (NaOH) representa la cantidad de μmol usados por minuto, que es igual a la cantidad de μmol de ácidos grasos liberados por minuto. El volumen (v) de enzima se expresó en μL , habiéndose usado 50 μL para todos los ensayos, y [E] es la concentración enzimática (mg en peso seco/ml), que fue 1 mg/ml.

Formación de emulsión

Las emulsiones se formaron mediante una mezcla de aceite de oliva (1 g) con una fase acuosa que constaba de tampón fosfato (1,13 mM, pH 7,0) y Tween-20 al 25% como tensioactivo modelo. En primer lugar, se batió la mezcla de tensioactivo y tampón en una Heidolph DIAx900 (potencial 6, 1 minuto), y posteriormente, se añadió la fase oleosa batiendo 5 minutos más. Se obtiene un líquido lechoso, y esta muestra se sonica en Branson Sonifier 450 (Control de salida 10 y Ciclo de trabajo 40%) en hielo durante 7 minutos para evitar el calentamiento. El tamaño de las gotas de las emulsiones se midió después de la producción en un DLS-Zeta-Sizer para asegurar la presencia de una distribución de gotas monodispersas. El tamaño de gota obtenido fue similar en todos los casos con el fin de eliminar efectos de diferente superficie en la lipólisis (Torcello-Gómez et al., 2011. *Soft Matter*, 7(13), 6167–6177).

20

Hidrólisis de emulsiones catalizada por lipasa pancreática

La determinación de la actividad de la lipasa pancreática mediante la técnica de pH-stat utilizando aceite de oliva en emulsión como sustrato se realizó siguiendo el método descrito en (Torcello-Gómez et al., 2011. *Soft Matter*, 7(13), 6167–6177). Se mezclaron 3 ml de emulsión con tampón duodenal hasta alcanzar 16 ml y sales biliares (5 mg/ml). Para este método, se agrega lipasa (1,6 mg/ml de lipasa) para iniciar la medición. Los inhibidores probados se incubaron con lipasa durante 15 min antes de la adición: orlistat (1.393 μg , 0.22 g/l) o silibinina (A) (5.573 μg , 0.88 g/l). Los ácidos grasos libres liberados por la lipólisis de las emulsiones se valoraron a pH constante mediante hidróxido de sodio (NaOH, 0,1 N) durante el curso de la hidrólisis. La titulación se realiza a 37 °C y a pH 7,0.

El experimento se basa en medir el volumen de NaOH necesario para mantener constante el pH en 7,0, exclusivamente para la lipasa y en presencia de sus inhibidores. El % de ácidos grasos libres producidos en cada caso se calculó mediante la ecuación 2:

$$\%FFA = 100 \times \left(\frac{V_{NaOH} \times m_{NaOH} \times M_{lipid}}{W_{lipid} \times 2} \right) \text{ Ecuación 2}$$

donde, V_{NaOH} es el volumen de NaOH añadido, m_{NaOH} es la molaridad de NaOH, M_{lipid} es el peso molecular del lípido usado y W_{lipid} es el peso del lípido usado.

5

Análisis de la lipólisis in vitro en una sola gota.

Los ensayos de tensión interfacial se realizaron siguiendo la metodología y protocolos descritos en detalle en Del Castillo-Santaella et al. (2015. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(47), 10333–10340). La tensión interfacial se mide en un sistema de gota pendiente descrita en detalle en (Maldonado-Valderrama et al., 2015. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 39, 51–60). El sistema está completamente controlado por ordenador mediante el Software DINATEN® (UGR) y la detección y cálculo del área superficial y tensión superficial son automáticos y basados en Axisymmetric Drop Shape Analysis (ADSA) (Cabrero-Vilchez et al., 1999. *Review of Scientific Instruments*, 70(5), 2438–2444). La gota de solución que constituye la fase acuosa se forma en la punta de un capilar que se sumerge en una cubeta de vidrio (Hellma®) llena con la fase oleosa, simulando así una emulsión aceite-agua y se mantiene en una celda termostatizada externamente a 37 °C para todos los experimentos. La tensión interfacial se registró en un área interfacial constante (20 mm²) y la elasticidad de dilatación de la capa interfacial se midió al final de la curva de adsorción al 5% de amplitud y 0,1 Hz como se describe en (Del Castillo-Santaella et al., 2014, *Soft Matter*, 10(48), 9702–9714; Del Castillo-Santaella et al., 2015. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(47), 10333–10340). Las curvas de adsorción y las respuestas de dilatación se registraron para la lipasa sola y en presencia de inhibidores como una prueba rápida de la inhibición de la lipólisis inducida por diferentes compuestos siguiendo la metodología descrita en detalle en (Del Castillo-Santaella et al., 2015. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(47), 10333–10340). Los inhibidores probados se incubaron con lipasa durante 15 min antes de la adición a las mismas concentraciones que en ensayos anteriores: Orlistat (0,22 g/l) y silibinina (A) (0,88 g/l).

Análisis estadístico

30

Los datos de la actividad de la lipasa pancreática representan valores medios ± desviaciones estándar a menos que se indique lo contrario. Para estimar el efecto inhibidor total de los compuestos probados, se estimó el AUC. Las diferencias estadísticas con respecto al efecto de Xenical (orlistat) y silibinina (A) se estimaron mediante un ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples, utilizando el software SPSS 25 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EEUU).

Los datos del efecto de concentración para agonistas y antagonistas se ajustaron mediante regresión no lineal, ajustando los datos a un modelo de pendiente variable, utilizando el software Prism 8.0 (GraphPAD, CA, EEUU). Los datos se combinaron de al menos tres muestras diferentes. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Búsqueda de posibles inhibidores del sitio activo de la lipasa pancreática

10 La lipasa pancreática es un objetivo de gran interés para la industria farmacéutica y, en consecuencia, se han desarrollado muchos antagonistas previos para el tratamiento de la obesidad. Esta situación y la disponibilidad de una estructura de rayos X de la lipasa pancreática nos permitió aplicar el *Virtual Screening* basado en el *docking* para la búsqueda de compuestos que interactúan de forma similar a otros compuestos cuya capacidad inhibitoria ya ha sido demostrada (Egloff et al., 15 1995. *Biochemistry*, 34, 2751–2762). Después de realizar cálculos de detección virtual, los 1000 compuestos principales con la puntuación de acoplamiento más alta se conservaron para un análisis visual adicional y para verificar si interactuaban con los residuos clave de lipasa. A continuación, Molport® verificó la disponibilidad de los compuestos y finalmente seleccionamos la silibinina (A) como resultados principales (Figura 2).

20

Dentro del centro catalítico de la lipasa pancreática, la serina152 juega un papel fundamental. Nuestros resultados mostraron que orlistat y silibinina (A) fueron capaces de unirse fuertemente a este residuo, lo que sugiere su actividad potencial como inhibidores de lipasa (Figura 2). Muy cercano a la serina152, un residuo de leucina ayuda a estabilizar la interacción proteína-fármaco. Curiosamente, nuestro análisis de detección virtual reveló que el orlistat y la silibinina (A) formaron un enlace de hidrógeno con este residuo. Otra diferencia importante con respecto a la interacción de la silibinina (A) con la lipasa pancreática se basa en el residuo his263 (Figura 2), otro miembro de la tríada catalítica de la lipasa pancreática (Lowe, 1992. *Journal of Biological Chemistry*, 267(24), 17069–17073). Los datos mostraron que el orlistat interactúa a través de puentes salinos con el anillo imidazol de his263 de la lipasa, mientras que estos puentes salinos estaban ausentes en el caso de la silibinina (A). Finalmente, otro regulador importante de la actividad de la lipasa pancreática, Phe77, mostró varias interacciones con los dos compuestos (Figura 2), el orlistat y la silibinina (A) estaban fuertemente vinculados a Phe77 a través de una interacción mediada por dos enlaces de hidrógeno.

30 35 Inhibición de la actividad de la lipasa pancreática en solución.

En primer lugar, se determinó la actividad de la lipasa basal en solución como control negativo de la inhibición de la lipasa, para luego poder compararla con la actividad máxima de esta enzima. En la misma línea, se utilizó orlistat como control positivo. De esta forma, los inventores establecieron cuántas unidades de lipasa podrían inhibirse con orlistat (tabla 1), lo que se consideró como máximo efecto inhibidor. En segundo lugar, se midió la actividad de la lipasa en presencia del inhibidor silibinina (A). De acuerdo con este protocolo experimental para evaluar la actividad de la lipasa, el orlistat y la silibinina proporcionaron valores similares a la lipasa (Tabla 1). Una razón de esto es la diferente solubilidad en agua del inhibidor en el sitio de reacción, lo que afecta de manera importante la medición directa de la actividad de la lipasa. El orlistat y la silibinina (A), son compuestos prácticamente insolubles en agua. El orlistat es soluble en etanol, mientras que la silibinina (A) es soluble en acetona. La lipasa pancreática se inhibe rápidamente en presencia compuestos solubles en agua, lo que favorece la inhibición de la lipasa, cuando la medida se realiza en solución. Sin embargo, este resultado está muy lejos de la situación real durante la digestión humana, donde se produce la lipólisis en la interfaz aceite-agua de los sistemas emulsionados. Por lo tanto, para obtener información precisa y fiable sobre la inhibición de la lipólisis, es importante desarrollar modelos más realistas de la acción de la lipasa, como se mostrará en la siguiente sección. Los resultados mostrados en la Tabla 1 se tomarán simplemente como información fundamental sobre la actividad de los compuestos en solución, sin una aplicabilidad realista de la situación *in vivo*.

20 **Tabla 1.** Valor medio de la actividad enzimática de la lipasa a 1 mg de peso seco por minuto. El valor medio se calculó usando secciones entre 2 y 8 minutos de cada ensayo, donde se realizó la mayor actividad catalítica. Los valores se obtienen como una media de al menos tres mediciones repetidas.

	Lipase +Orlistat	Lipase +Silibinin(A)	<i>p</i> (ANOVA)
Actividad enzimática en peso seco U/ (mg min)	30 ± 10	23 ± 10	24 ± 5

25 Los datos representan la media ± desviación estándar. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante un ANOVA de una vía. *La prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Tukey reveló diferencias significativas (*p* = 0.016).

Inhibición de la actividad de la lipasa pancreática en las interfaces aceite-agua

La actividad inhibidora de la silibinina (A) sobre la acción de la lipasa se evaluó mediante la prueba rápida basada en medidas de tensión interfacial que se desarrolló en un trabajo anterior (Del Castillo-Santaella et al., 2015. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(47), 10333–10340). El experimento allí diseñado consistió en medir el perfil de adsorción de Lipasa + Inhibidor y compararlo 5 con el perfil de adsorción de lipasa y Lipasa + Orlistat como controles negativos y positivos, respectivamente. Todas las medidas se realizaron en una gota acuosa sumergida en la fase oleosa imitando la emulsión aceite-agua y, por tanto, las condiciones fisiológicas del duodeno. La disminución de la tensión interfacial (obtenida después de 1 hora de adsorción) depende de la adsorción de lipasa y de los productos de lipólisis en la interfaz, de modo que, cuanto menor es la tensión interfacial, mayor lipólisis se produce. Los controles positivos y negativos fueron previamente identificados (Del Castillo-Santaella et al., 2015. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(47), 10333–10340) siendo control negativo: 5 mN/m (sin inhibición de la enzima lipasa en la interfaz aceite-agua) y control positivo: 9 mN/m (inhibición total de lipasa en la interfaz aceite-agua). Luego, la elasticidad dilatacional de la capa adsorbida proporciona información adicional sobre la conformación molecular, la composición y el modo de inhibición. Sin embargo, la complejidad de esta magnitud no permite establecer compuestos positivos y negativos como ocurre con la tensión interfacial (Del Castillo-Santaella et al., 2015. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(47), 10333–10340).

20 Con estas premisas, se midió la tensión interfacial y la elasticidad dilatacional para el inhibidor potencial propuesto en este estudio, silibinina (A), y se comparó con lipasa y lipasa + orlistat a concentraciones fijas. Los valores finales después de 1 hora de adsorción se representan en la Figura 3. La Figura Materiales suplementarios 2 muestra las curvas de adsorción dinámica medidas para alcanzar el estado final de lipasa + silibinina (A) en la interfaz aceite-agua en comparación con los 25 perfiles de adsorción de lipasa y lipasa + orlistat que se muestran en la Figura 3.

Por un lado, la Figura 3 no muestra diferencias significativas para Lipasa + Silibinina (A) en comparación con el control negativo, tanto en la tensión interfacial como en la elasticidad interfacial de dilatación. Este resultado posiblemente también esté relacionado con la falta de solubilidad de la 30 silibinina (A) en agua. Las soluciones se prepararon en acetona, que también es poco soluble en agua y, por lo tanto, esta metodología no parece ser válida para evaluar el potencial inhibitorio de la silibinina (A).

El orlistat se une de forma covalente pero reversible al residuo de serina del sitio activo de la lipasa, 35 pero no parece alterar la molécula de lipasa (Bénarouche et al., 2014. *Biochimie*, 101(0), 221–231).

Por consiguiente, la alta elasticidad de dilatación de Lipasa + Orlistat se origina a partir de la estructura compacta de la lipasa como se analiza en detalle en Del Castillo-Santaella et al. (2015. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(47), 10333–10340).

5 Inhibición de la lipólisis in vitro en una emulsión modelo.

En vista de los resultados anteriores, la inhibición de la lipasa pancreática por silibinina (A) se analizó en un modelo más realista midiendo la liberación de FFA de una emulsión aceite-agua estabilizada con Tween20 en ausencia y presencia de inhibidores. Esta metodología permite medir in vitro, 10 la lipólisis de emulsiones modelo simulando las condiciones del duodeno, siendo bastante representativa de la situación *in vivo* como se demostró recientemente (Deloid et al., 2018. *ACS Nano*, 12(7), 6469–6479).

La figura 4 muestra la influencia de diferentes inhibidores sobre la lipólisis en emulsiones modelo 15 de aceite de oliva, medidas utilizando el método de pH descrito previamente. La velocidad y el grado de liberación de FFA disminuyeron en el siguiente orden: Lipasa> Lipasa + Silibinina> Lipasa + Orlistat (Figura 4). La supresión de la digestión de lípidos por la silibinina (A) se acerca de manera importante se asemeja a la de orlistat. En cuanto a la solubilidad de la silibinina (A), parece haber mejorado por emulsificación; la presencia de emulsionante y sales biliares y también la solubilización 20 parcial en la fase oleosa podrían ser responsables de la mejor solubilidad alcanzada. En cualquier caso, los resultados de la Figura 4 permiten evaluar el potencial inhibidor de la silibinina (A) y también, confirmar su alto potencial inhibitorio.

La Figura 4 también cuantifica la actividad de lipasa y Lipasa + Inhibidor en emulsión de aceite de 25 oliva. La presencia de orlistat disminuye la actividad de la lipasa en un 71% y se obtuvo una inhibición similar con Lipasa-Silibinina (A) (65%) (Figura 4).

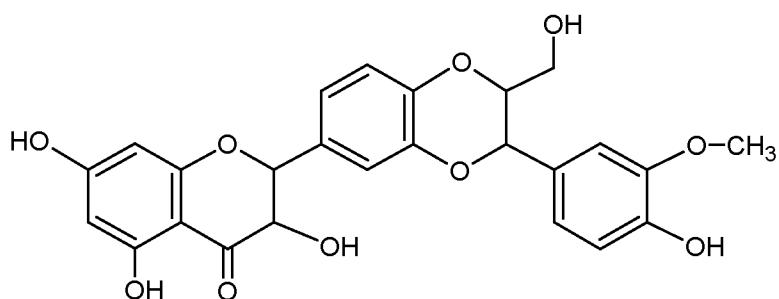
Estos resultados permiten extender e interpretar hallazgos previos a condiciones más realistas y 30 también vincularlos con aspectos estructurales. Los resultados experimentales demuestran que la silibinina (A) es un inhibidor y un agente prometedor en el desarrollo de compuestos naturales para reducir la ingesta de grasas. Sin embargo, el efecto inhibidor de la silibinina (A) se acerca al de orlistat. El rendimiento mejorado de la silibinina (A) podría estar relacionado con su interacción mejorada con los sitios hidrófobos de la lipasa, que parece ser un factor determinante en los efectos inhibidores. Se puede especular que la silibinina (A) inhibe la actividad de la lipasa pancreática

principalmente a través del bloqueo de los cambios conformacionales que exponen el centro catalítico cuando la lipasa entra en contacto con la interfaz aceite-agua.

5 Esto concuerda con los resultados del cribado virtual. La silibinina (A) pudo interactuar con el aminoácido trp252, que se ha descrito como un factor crucial para la estabilización de la tapa con el centro catalítico de la lipasa pancreática. Además, la ubicación de detección virtual de la silibinina (A) sugiere que sobresale de la superficie de la enzima, por lo que podría entrar en contacto más fácilmente con la interfaz aceite-agua y, por lo tanto, evitar la lipólisis.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende
- orlistat y
- 5 - un compuesto de fórmula general (I) o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, ésteres, tautómeros, isómeros, solvatos o hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones,



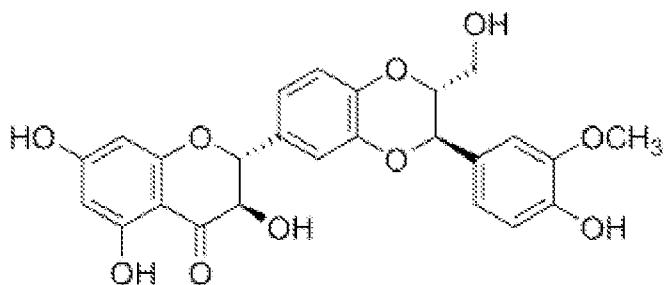
10

Fórmula (I)

para su uso en la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la obesidad.

2. La composición según la reivindicación anterior, donde el compuesto de fórmula general (I) es la Sillibinina A, de fórmula general (IIA).

15



Fórmula (II A)

3. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que además comprende un transportador o carrier farmacéuticamente aceptable, un excipiente o un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20

4. Una forma farmacéutica que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la obesidad.

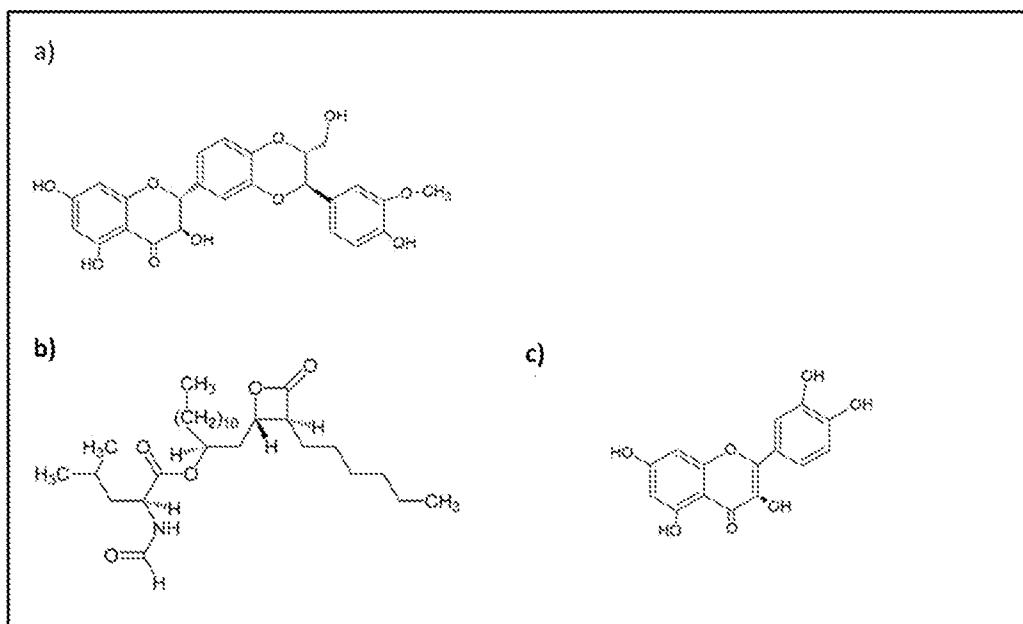


Fig. 1

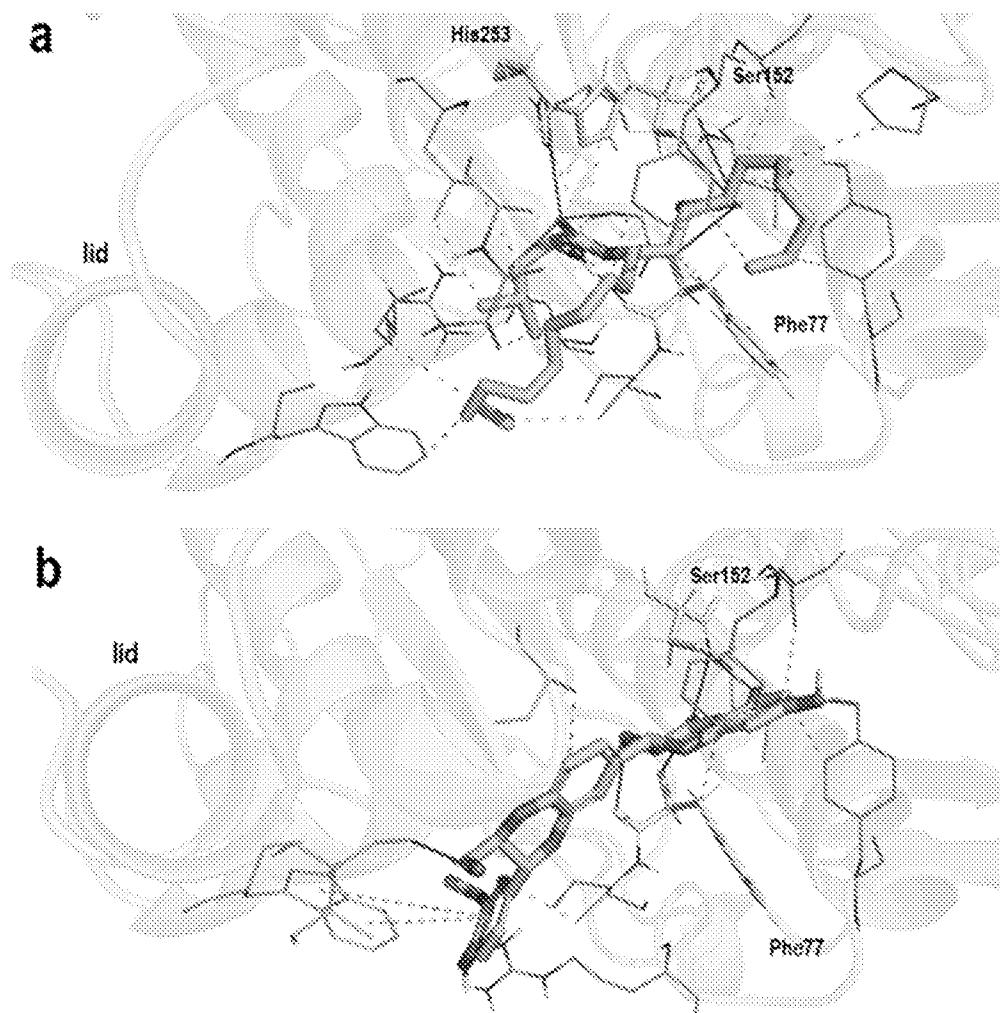


Fig. 2

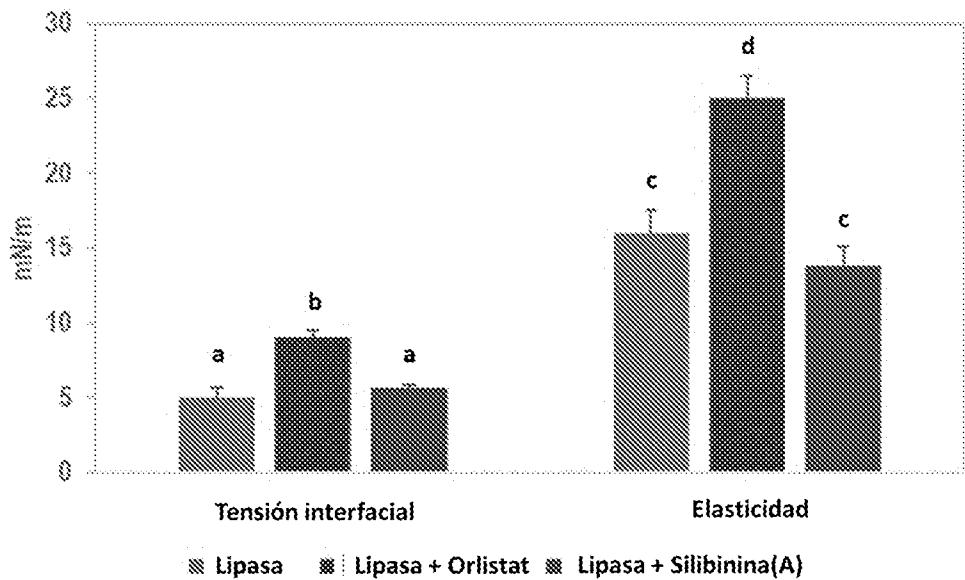


Fig. 3

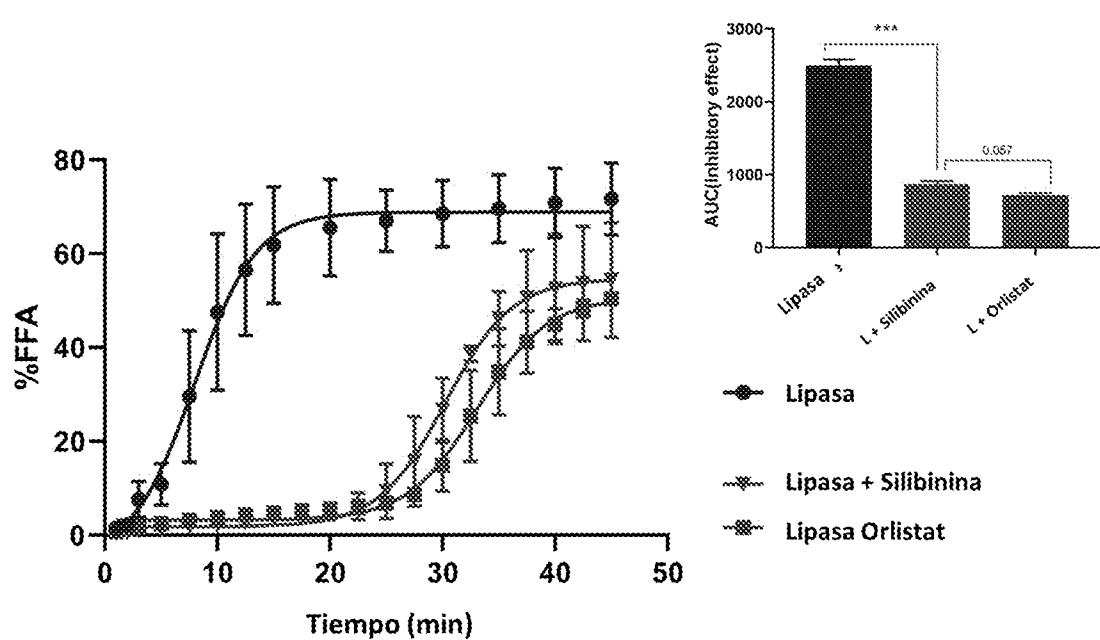


Fig. 4