

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 914 517**

21 Número de solicitud: 202031235

51 Int. Cl.:

A61K 31/192 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22

Fecha de presentación:

11.12.2020

43

Fecha de publicación de la solicitud:

13.06.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

02.09.2022

Fecha de concesión:

06.10.2022

45

Fecha de publicación de la concesión:

14.10.2022

73

Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)
Hospital Real. Avda. del Hospicio s/n
18071 Granada (Granada) ES**

72

Inventor/es:

**LÓPEZ GARCÍA, Luis Carlos;
HIDALGO GUTIÉRREZ, Agustín;
BARRIOCANAL CASADO, Eliana;
GONZÁLEZ GARCÍA, Pilar y
DÍAZ CASADO, M^a Elena**

54

Título: **COMPUESTO PARA REDUCCIÓN DE TEJIDO ADIPOSO BLANCO Y TRATAMIENTO DE SOBREPESO Y OBESIDAD**

57

Resumen:

La presente invención se refiere al ácido β -resorcílico, para su uso en la reducción de la cantidad de tejido adiposo blanco. Los inventores han descubierto que el ácido β -resorcílico causa una reducción selectiva de tejido adiposo blanco sin afectar la masa muscular esquelética. La presente invención permite así el uso terapéutico del ácido β -resorcílico en la prevención de la acumulación de tejido adiposo blanco o reducción de tejido adiposo blanco. La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica, al uso no terapéutico del ácido β -resorcílico y a una composición nutracéutica o alimento funcional, producto dietético o suplemento nutricional.

ES 2 914 517 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

**COMPUESTO PARA REDUCCIÓN DE TEJIDO ADIPOSO BLANCO Y TRATAMIENTO
DE SOBREPESO Y OBESIDAD**

5 Campo de la invención

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina, y se refiere a un compuesto, el ácido β -resorcílico, para su uso en la reducción de la cantidad de tejido adiposo blanco. Dentro de este ámbito, cobra especial interés el uso de este compuesto para el tratamiento del sobrepeso y/o la obesidad, pudiendo estar estas también asociadas a síndrome metabólico o esteatosis hepática.

Antecedentes de la invención

15 La organización mundial de la salud (OMS) define el sobrepeso y la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo blanco (TAB) que puede ser perjudicial para la salud. Dicha acumulación de TAB ocurre habitualmente por el desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas, habiéndose casi triplicado la incidencia mundial de obesidad entre 1975 y 2016. De hecho, en 2016, el 39% de las personas adultas de 18 o más años tenían sobrepeso, y el 13% eran obesas; y había más de 340 millones de niños y adolescentes (de 5 a 19 años) con sobrepeso u obesidad.

El tejido adiposo comprende adipocitos (o células adiposas) y es la principal reserva de energía del cuerpo. Se conocen dos tipos de tejido adiposo, identificados en función de sus características morfológicas y funcionales: el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo pardo. Los adipocitos del tejido adiposo blanco son células redondeadas grandes (25-200 mm) caracterizadas por una gran gota lipídica unilocular, compuesta de triglicéridos y otros lípidos, rodeada por una fina capa de citoplasma, pocas mitocondrias y un núcleo plano y desplazado a la periferia. Las principales funciones del tejido adiposo blanco son la acumulación de energía en forma de triacilgliceroles, el aislamiento térmico y la secreción de adipocinas (o adipocinas) que regulan diversos procesos biológicos de forma autocrina, paracrina y endocrina. Los adipocitos también son importantes para mantener la homeostasis de glucosa y lípidos en el organismo.

35 El sobrepeso y la obesidad son factores importantes de riesgo de enfermedades no transmisibles, entre las que destaca la diabetes tipo II y el síndrome metabólico, así como

las consecuencias que esto desencadena en la contribución a enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y en trastornos del aparato locomotor.

5 La diabetes tipo II es una anomalía en la regulación de la glucosa sanguínea y almacenamiento de nutrientes relacionada con la resistencia a las acciones de la insulina, con implicaciones de otras hormonas y mecanismos de acción inter e intracelulares. Sin embargo, las evidencias sugieren que la diabetes característica de la resistencia a insulina es solo un aspecto de un síndrome de trastornos metabólicos. La hiperglucemia en estos
10 pacientes suele asociarse a obesidad intra-abdominal, concentraciones plasmáticas de triglicéridos elevadas y de HDL disminuidas, hipertensión, inflamación sistémica, fibrinólisis anormal, función anormal del endotelio vascular, y enfermedad macrovascular (enfermedad coronaria, cerebrovascular y arterial periférica). El conjunto de estas anomalías se conoce como síndrome metabólico y, en la práctica, el paciente con esta patología debe reunir al menos tres de los siguientes criterios: obesidad abdominal (cintura
15 mayor de 88 cm en mujeres y 102 cm en hombres), triglicéridos séricos por encima de 150 mg/dL, niveles de HDL por debajo de 50 mg/dL en hombres y 40 mg/dL en mujeres, presión arterial por encima de 130/85 mmHg y glucosa plasmática en ayunas por encima de 100 mg/dL.

20 Las anomalías en la red, estructura y función mitocondrial es uno de los mecanismos patológicos que contribuyen a las características, consecuencias y evolución de la resistencia a insulina, síndrome metabólico y obesidad. Un descenso en el número de mitocondrias y en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, así como una disfunción mitocondrial más generalizada, se ha descrito en hígado y músculo esquelético
25 de pacientes con diabetes tipo II. Asimismo, se ha descrito un descenso en los niveles de proteínas de biosíntesis de Coenzima Q (CoQ), así como de los niveles mitocondriales de CoQ, en músculo y tejido adiposo de pacientes con resistencia a insulina y de ratones a los que se le induce dicha resistencia a insulina a través de una dieta alta en grasas y sacarosa (HFHS).

30

Diferentes estrategias farmacológicas se vienen usando para el tratamiento de la diabetes tipo II, el síndrome metabólico o la obesidad. Sin embargo, los resultados son dispares en la población afectada debido a la efectividad de los tratamientos y a la presencia de efectos secundarios. Entre estos tratamientos se incluye la metformina, un inhibidor del Complejo
35 I de la mitocondria que puede desencadenar efectos secundarios en tratamientos crónicos; inhibidores del co-transportador sodio-glucosa, que estimula la excreción urinaria de

glucosa; agonistas del receptor GLP-1 e inhibidores de DPP-4, que estimulan el sistema incretina para bajar la glucosa en sangre; las sulfonilureas, que estimulan la liberación de insulina por el páncreas; y las tiazolidinedionas, que estimulan la biogénesis mitocondrial vía PPAR γ .

5

El peso corporal de un individuo viene representado aproximadamente por un 80% de tejido magro (o masa libre de grasa) y por un 20% de tejido adiposo (o grasa de almacenamiento). El contenido del tejido magro es muy heterogéneo e incluye huesos, músculos, agua extracelular, tejido nervioso y el resto de células y tejidos que no son adipocitos o células grasas. En consecuencia, una reducción del peso corporal puede deberse a una pérdida de contenido de cualquiera de estos componentes y, en consecuencia, no se puede vincular una reducción del peso a una reducción del tejido graso.

10

Por ejemplo, la sarcopenia es un síndrome asociado al envejecimiento que se debe a una reducción progresiva de la masa muscular esquelética. Al desencadenarse esa pérdida de masa muscular esquelética se produce una reducción del peso corporal (Fried et al., J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2001;56: M146–56). Una reducción de peso corporal se puede asociar también a una reducción en la densidad ósea, como ocurre en el proceso de osteoporosis (Tirosh et al., J Clin Endocrinol Metab 2015;100(6):2463-7). Estos ejemplos suponen una evidencia clara de pérdida de peso no vinculada a la pérdida de tejido graso.

15

20

Además, la pérdida de peso que se produce tanto en regímenes nutricionales como entrenamientos específicos no tiene por qué deberse a una pérdida de tejido graso (Ramírez-Velez et al., Nutrients 2020 Jul 26;12(8):2231). Es más, dietas específicas para perder peso inducen frecuentemente una pérdida de masa muscular y, por ello, hay una intensa actividad investigadora para la búsqueda de opciones terapéuticas que consigan una reducción de tejido graso sin pérdida de masa muscular (Verreijen et al., Am J Clin Nutr 2015;101(2):279-86).

25

El ácido β -resorcílico (β -RA) pertenece a los de ácidos hidroxibenzoicos, un grupo de compuestos fenólicos naturales presentes en plantas. El β -RA es capaz de interferir en el metabolismo de la CoQ y actuar como agente terapéutico en las deficiencias primarias en CoQ (Hidalgo-Gutiérrez A, Barriocanal-Casado E, Bakkali M, et al. EMBO Mol Med. 2019; 11(1): e9466), un grupo de enfermedades mitocondriales poco frecuentes. Además, se ha descrito que el β -RA disminuye el peso corporal en ratones *CAG-CreER^{T2};Mclk1^{Loxp/Loxp}*, que los autores denominan “ratones control”. No obstante, no se especifica a qué se debe

30

35

dicha reducción en el peso corporal (Wang Y, Oxer D, Hekimi S. Nat Commun. 2015; 6:6393).

Breve descripción de la invención

5

De forma inesperada, los inventores han descubierto que el ácido β -resorcílico causa una reducción selectiva de tejido adiposo blanco sin afectar la masa muscular esquelética. La presente invención permite así el uso del ácido β -resorcílico en el tratamiento de afecciones como el sobrepeso o la obesidad sin efectos secundarios sobre la masa muscular esquelética. Además, tal efecto también se extiende al tratamiento de las afecciones anteriores asociadas con síndrome metabólico o esteatosis hepática. La reducción del tejido adiposo blanco conlleva a una reducción de la aparición de gotas lipídicas en el hígado cursadas por alguna de las afecciones anteriores.

10

15

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al ácido β -resorcílico, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso en la prevención de la acumulación de tejido adiposo blanco o reducción de tejido adiposo blanco.

20

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácido β -resorcílico, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en la prevención de la acumulación de tejido adiposo blanco o reducción de tejido adiposo blanco.

25

La presente invención también contempla la prevención de acumulación de tejido adiposo blanco o la reducción de tejido adiposo blanco en animales, preferiblemente mamíferos, aún más preferiblemente humanos, que no sufran una enfermedad asociada a un exceso de tejido adiposo blanco. Así, en un tercer aspecto la invención se refiere al uso no terapéutico del ácido β -resorcílico, o sales del mismo, en la prevención de la acumulación de tejido adiposo blanco o reducción de tejido adiposo blanco.

30

Un cuarto aspecto de la invención va dirigido a una composición nutracéutica o alimento funcional, producto dietético o suplemento nutricional, que comprende ácido β -resorcílico, caracterizado en que el ácido β -resorcílico se encuentra en una concentración superior a 5% en p/p.

35

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Gráfica de supervivencia general de ratones wild-type durante su desarrollo. La línea negra representa ratones wild-type en dieta estándar, mientras que la línea gris representa ratones wild-type en dieta estándar suplementados con β -RA. La flecha que
5 señala una línea vertical significa el inicio del tratamiento.

Figura 2. Gráfica de supervivencia en la etapa de vejez (24 meses) de ratones wild-type durante su desarrollo. La barra negra representa ratones wild-type en dieta estándar (WT), mientras que la barra gris representa ratones wild-type en dieta estándar suplementados con β -RA (WT+b-RA).
10

Figura 3. Cambios en peso corporal de ratones wild-type durante su desarrollo. Gráfica de peso corporal durante el desarrollo de ratones wild-type machos (A) y hembras (B). La línea negra representa ratones wild-type en dieta estándar (WT), mientras que la línea gris representa ratones wild-type en dieta estándar suplementados con β -RA (WT+b-RA). **
15 $P < 0,01$ vs wild-type en dieta estándar; *** $P < 0,001$ vs wild-type en dieta estándar.

Figura 4. Imágenes representativas del aspecto interno y de los tejidos de ratones wild-type al inicio de la vejez. (A y C) Ratón macho wild-type en dieta estándar a los 18 meses de edad; (B y D) Ratón macho wild-type en dieta estándar suplementada con β -RA a los
20 18 meses de edad; (E y G) Ratón hembra wild-type en dieta estándar a los 18 meses de edad; (F y H) Ratón hembra wild-type en dieta estándar a los 18 meses de edad.

Figura 5. Peso del tejido adiposo blanco abdominal y visceral y de la musculatura esquelética de las piernas traseras de ratones wild-type al inicio de la vejez (18 meses de edad). (A-B) Peso del tejido adiposo blanco abdominal y visceral de ratones macho (A) y hembras (B); (C-D) peso de la musculatura esquelética de las piernas traseras de ratones macho (C) y hembras (D); (E-F) peso del tejido adiposo blanco abdominal y visceral relativo al total del peso corporal de ratones macho (E) y hembras (F); (G-H) peso de la musculatura esquelética de las piernas traseras relativo al total del peso corporal de ratones macho (G) y hembras (H). Las barras negras representan los valores en ratones wild-type en dieta standard (WT), mientras que las barras grises representan los valores en ratones wild-type en dieta estándar suplementados con β -RA (WT+b-RA). * $P < 0,05$ vs wild-type en dieta estándar; ** $P < 0,01$ vs wild-type en dieta estándar; *** $P < 0,001$ vs wild-type en dieta estándar.
35

Figura 6. Test de fuerza de agarre de las piernas traseras de ratones wild-type al inicio de la vejez (18 meses de edad). (A y B) Fuerza de agarre de ratones macho (A) y hembras (B); (C y D) Fuerza de agarre corregido por el peso total de ratones macho (C) y hembras (D). Las barras negras representan los valores en ratones wild-type en dieta estándar, mientras que las barras grises representan los valores en ratones wild-type en dieta estándar suplementados con β -RA. * $P < 0,05$ vs wild-type en dieta estándar; ** $P < 0,01$ vs wild-type en dieta estándar; *** $P < 0,001$ vs wild-type en dieta estándar.

Figura 7. Test de coordinación motora de ratones wild-type al inicio de la vejez (18 meses de edad). (A y B) Test de coordinación motora en ratones macho (A) y hembras (B). Las barras negras representan los valores en ratones wild-type en dieta estándar, mientras que las barras grises representan los valores en ratones wild-type en dieta estándar suplementados con β -RA. * $P < 0,05$ vs wild-type en dieta estándar; ** $P < 0,01$ vs wild-type en dieta estándar; *** $P < 0,001$ vs wild-type en dieta estándar.

Figura 8. Imágenes histológicas representativas de la morfología hepática de ratones wild-type al inicio de la vejez (18 meses de edad). Imagen histológica con tinción H&E representativa del hígado de un ratón macho (A-C) y hembra (D-F), y de un ratón con suplemento con β -RA macho (G-I) y hembra (J-L).

Figura 9. Imágenes histológicas representativas de la morfología hepática de ratones wild-type al inicio de la vejez (18 meses de edad). Imagen histológica con tinción "Oil Red O" representativa del hígado de un ratón macho (M-O) y hembra (P-R), y de un ratón con suplemento con β -RA macho (S-U) y hembra (V-Y).

Figura 10. Representación de la producción de acetil-CoA y su uso en el ciclo de Krebs en la mitocondria, indicando aquellas proteínas que están sobre expresadas en mitocondrias de riñón tratadas con β -RA. Las proteínas marcadas con un asterisco (*) indican que están sobreexpresadas con el tratamiento con β -RA, con un incremento por encima de 1,5 con respecto a ratones sin tratar y un valor de $p < 0,01$. Las proteínas marcadas con una almohadilla (#) indican que están sobreexpresadas, sin que necesariamente cumplan los dos criterios anteriores de incremento por encima de 1,5 y valor de $p < 0,01$. Los diferentes símbolos tienen el significado indicado a continuación:

Symbol	Entrez Gene Name	UniProt	Expr p-value	Expr Fold Change
DLD	dihydrolipoamide dehydrogenase	Q08749	0.000177	1.831
PDHB	pyruvate dehydrogenase E1 subunit beta	Q9D051	0.00194	1.711
DLAT	dihydrolipoamide S-acetyltransferase	Q88MF4	0.0007	1.638
PDHA1	pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha 1	P35486	0.00207	1.61
DLD	dihydrolipoamide dehydrogenase	Q08749	0.000177	1.831
IDH3A	isocitrate dehydrogenase [NAD(+)] 3 catalytic subunit alpha	Q9D6R2	0.00268	1.72
IDH3G	isocitrate dehydrogenase [NAD(+)] 3 non-catalytic subunit gamma	P70404	0.023	1.573
IDH3B	isocitrate dehydrogenase [NAD(+)] 3 non-catalytic subunit beta	Q91V47	0.000942	1.727
OGDH	oxoglutarate dehydrogenase	Q60597	0.0000064	2.05
DLST	dihydrolipoamide S-succinyltransferase	Q9D2G2	0.0000204	2.316
C5	citrate synthase	Q9CZJ6	0.0404	1.485
ACO2	Aconitase 2	Q99X10	0.0765	1.383
SUCLG1	Succinate CoA ligase subunit alpha	Q9WJ45	0.234	1.301
SUCLG2	Succinate CoA ligase subunit beta	Q9T218	0.271	1.189
MDH2	malate dehydrogenase 2	P08249	0.0559	1.397

Figura 11. Ensayo de proliferación celular en preadipocitos 3T3L1 y mioblastos C2C12. (A) Porcentaje de células 3T3L1 tras 5 días en condiciones de proliferación; (B) Porcentaje de células C2C12 tras 5 días en condiciones de proliferación. *** $P < 0,001$ vs células sin tratar. Las barras solidas representan las células cultivadas en DMEM-GlutaMAX rico en glucosa suplementado con 10 % de BCS o FBS, 1% de amino ácidos no esenciales MEM y 1% de antibiótico/antimicótico y las barras con cuadrícula representan las mismas células cultivadas en el mismo medio pero en presencia de 1 mM de β -RA.

Figura 12. Gráfica de peso corporal durante el desarrollo de ratones wild-type sometidos a dieta alta en grasa y sacarosa (HFHS) durante 16 semanas para ratones machos (A) y hembras (B). La línea que une círculos representa ratones wild-type en dieta estándar; la línea que une cuadrados representa ratones wild-type en dieta HFHS; la línea que une triángulos representa ratones wild-type en dieta HFHS tratado con suplemento de β -RA.

Figura 13. Cambios en peso del tejido adiposo blanco abdominal y visceral de ratones wild-type sometidos a dieta alta en grasa y sacarosa (HFHS) durante 16 semanas. (A-B) Peso del tejido adiposo blanco abdominal y visceral de ratones macho (A) y hembras (B); (C-D) peso del tejido adiposo blanco abdominal y visceral relativo al total del peso corporal de ratones macho (C) y hembras (D); (E-F) peso de la musculatura esquelética de las piernas traseras de ratones macho (E) y hembras (F); (G-H) peso de la musculatura esquelética de las piernas traseras relativo al total del peso corporal de ratones macho (G) y hembras (H). En cada gráfica, la barra de la izquierda representa ratones wild-type en dieta estándar; la barra del centro representa ratones wild-type en dieta HFHS; la barra de la derecha

representa ratones wild-type en dieta HFHS tratado con suplemento de β -RA. * $P < 0,05$ vs wild-type en dieta estándar; ** $P < 0,01$ vs wild-type en dieta estándar; & $P < 0,05$ vs wild-type en dieta HFHS.

5 **Descripción detallada de la invención**

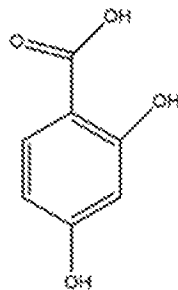
La presente invención se centra en el uso del ácido β -resorcílico (β -RA) y sus sales, incluidos las farmacéuticamente aceptables, para la reducción de tejido adiposo blanco (TAB), y en particular, en el tratamiento del sobrepeso y/o la obesidad.

10

El experto en la materia ha de entender que las distintas realizaciones particulares y preferidas descritas a continuación para cada aspecto no están limitadas a cada aspecto sino que pueden aplicarse a aspectos diferentes. Por ejemplo, ha de entenderse que una realización particular de un uso terapéutico de la invención también es una realización particular de un uso no terapéutico, o de una composición farmacéutica.

15

El término “ácido β -resorcílico” o “ β -RA” hace referencia a un compuesto de fórmula (I):



20

(I)

Otras denominaciones equivalentes de este compuesto son “ácido 2,4-dihidroxibenzoico”, “2,4-DHBA” y “ácido β -resorcinólico”. En la presente solicitud, el ácido β -resorcílico también puede representarse por “b-RA” y el experto en la materia entenderá que el texto “□-RA” es un error ortográfico que debe interpretarse como β -RA.

25

Salvo indicación en contrario, la presente invención no contempla solamente el ácido β -resorcílico sino también sus sales, incluidas las farmacéuticamente aceptables. Ejemplos no limitativos de sales del ácido β -resorcílico son, por ejemplo, la sal de plomo, monosódica o disódica.

30

Además del β -RA, en la presente invención también se contemplan otros compuestos activos. En una realización particular, salvo indicación en el contrario, se considera que “ β -RA” puede referirse a cualquier análogo del ácido 2,4-dihidroxibenzoico, preferentemente ácido 4-hidroxibenzoico o el ácido 3,4-dihidroxibenzoico, así como cualquiera de sus sales; cualquier equivalente biológico funcional, y cualquier combinación de los anteriores. En una realización preferida, β -RA es ácido β -resorcílico.

En la presente solicitud, salvo indicación en contrario, el término “masa grasa” se refiere al peso corporal constituido por el tejido blanco adiposo.

El término “WT” significa “wild-type”.

Nutracéutico se define como cualquier sustancia que es un alimento o parte de un alimento y proporciona beneficios médicos y/o para la salud, que incluyen la prevención y el tratamiento de enfermedad.

Uso terapéutico

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el índice de masa corporal (IMC) – peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros (kg/m^2) – es un índice utilizado para clasificar el sobrepeso y la obesidad en adultos. La OMS define el sobrepeso como un IMC igual o superior a 25, y la obesidad como un IMC igual o superior a 30.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al ácido β -resorcílico, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso en la prevención de la acumulación de tejido adiposo blanco o reducción de tejido adiposo blanco.

Los inventores han descubierto que el ácido β -resorcílico causa una reducción selectiva de tejido adiposo blanco sin afectar la masa muscular esquelética. Por lo tanto, una realización preferida de la presente invención contempla que el uso del ácido β -resorcílico esté caracterizado porque preserva el contenido en masa muscular esquelética.

La presente invención puede emplearse en animales, pero esta preferiblemente destinada a mamíferos, preferiblemente humanos. Así, en una realización particular, el uso del ácido β -resorcílico se caracteriza porque es para su uso en mamíferos, preferiblemente en humanos.

En una realización particular del uso del ácido β -resorcílico en humanos, el uso es caracterizado porque los humanos pertenecen a una población con edad igual o superior a 30 años, igual o superior a 40 años, preferiblemente igual o superior a 50 años.

5

En una realización particular de la invención, el uso del ácido β -resorcílico está caracterizado porque es para la prevención y/o tratamiento del sobrepeso, de la obesidad, o de afecciones asociadas al síndrome metabólico, esteatosis, preferiblemente la esteatosis hepática, o acumulación de gotas lipídicas en el hígado o para la prevención de enfermedades del corazón, prevención de cáncer y de accidentes cerebrovasculares.

10

De acuerdo con la International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional de Investigación del Cáncer), y con base en estudios epidemiológicos, las personas con obesidad y/o sobrepeso presentan mayor riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer, como adenocarcinoma en el esófago, cáncer en el colon, cáncer de mama (en mujeres postmenopáusicas), cáncer endometrial y cáncer en los riñones.

15

Por este motivo, la presente invención también contempla el uso del ácido β -resorcílico en la prevención del cáncer, preferiblemente en la prevención del adenocarcinoma, cáncer en el colon, cáncer de mama, cáncer endometrial y cáncer en los riñones, preferiblemente en personas que sufran de sobrepeso y obesidad.

20

Además de mayor riesgo de cáncer, las personas con obesidad y/o sobrepeso presentan también mayor riesgo de otras enfermedades como las del corazón y también riesgo de accidentes cerebrovasculares. Así, en una realización particular, la presente invención también contempla el uso del ácido β -resorcílico en la prevención de enfermedades del corazón y de accidentes cerebrovasculares, preferiblemente en personas que sufran de sobrepeso y obesidad.

25

La esteatosis o cambio graso es el nombre que recibe en anatomía patológica la acumulación anormal de triglicéridos en el citoplasma de células parenquimatosas. Lo más frecuente es que se dé en el hígado (esteatosis hepática o hígado graso, incluido el hígado graso no alcohólico), pero también aparece en corazón, riñón, y otros órganos.

30

El síndrome metabólico (también conocido como síndrome X, síndrome plurimetabólico, síndrome de insulinoresistencia, síndrome de Reaven) es un conjunto de factores

35

fisiológicos, bioquímicos, clínicos y metabólicos que conllevan un aumento del riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular o diabetes mellitus tipo 2 y fallecer por ello. Estos factores se pueden resumir en resistencia a la insulina, exceso de grasa abdominal, dislipidemia aterogénica, disfunción endotelial, susceptibilidad genética, hipertensión arterial, estado de hipercoagulabilidad y estrés crónico. Las causas subyacentes a este síndrome se relacionan con un exceso de calorías, azúcar, grasas y sal, preferiblemente con un exceso de calorías, azúcar y grasas.

El primer aspecto de la presente invención también podría definirse de las siguientes formas alternativas:

Un método para la prevención de la acumulación de tejido adiposo blanco o reducción de tejido adiposo blanco que comprende la administración de una cantidad eficaz del ácido β -resorcílico, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en un animal que lo necesita.

Uso del ácido β -resorcílico, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en la preparación de un medicamento útil para la prevención de la acumulación de tejido adiposo blanco o reducción de tejido adiposo blanco.

Composición farmacéutica

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácido β -resorcílico, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en la prevención de la acumulación de tejido adiposo blanco o reducción de tejido adiposo blanco.

En una realización particular, la composición farmacéutica se caracteriza porque preserva el contenido en masa muscular esquelética.

En otra realización particular, la composición farmacéutica se caracteriza porque el uso es para la prevención y/o tratamiento del sobrepeso, de la obesidad, o de afecciones asociadas al síndrome metabólico, esteatosis, preferiblemente la esteatosis hepática, o acumulación de gotas lipídicas en el hígado o para la prevención de enfermedades del corazón, prevención de cáncer y de accidentes cerebrovasculares.

En algunas realizaciones, el ácido β -resorcílico puede administrarse usando

- composiciones veterinarias o farmacéuticas o nutracéuticas que incluyen ácido β -resorcílico, si es apropiado en forma de sal, o bien usado solo o bien en forma de una combinación con uno o más portadores compatibles y aceptables desde el punto de vista veterinario, farmacéutico o nutracéutico, tales como diluyentes o adyuvantes, o con otro agente. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) da a conocer una variedad de excipientes usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de las mismas.
- 5
- 10 En una realización, se proporcionan composiciones que comprenden ácido β -resorcílico o una sal del mismo, y un excipiente, portador o diluyente aceptable. La composición también puede estar en una variedad de formas que incluyen, pero no se limitan a, formulaciones orales, formulaciones inyectables y formulaciones tópicas, dérmicas o subdérmicas.
- 15 En una realización preferida, la composición es oral, es decir, está formulada en una forma adecuada para su uso oral, por ejemplo, como complementos dietéticos, pastillas para chupar, productos masticables, comprimidos, cápsulas duras o blandas, emulsiones, suspensiones acuosas o aceitosas, disoluciones acuosas o aceitosas, gránulos o polvos dispersables, jarabes o elixires. Las composiciones destinadas para su uso oral pueden prepararse según cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones veterinarias, farmacéuticas o nutracéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes de amargor, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes con el fin de proporcionar preparaciones elegantes y aceptables.
- 20
- 25 En formato de comprimido, éstos pueden contener el ácido β -resorcílico en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes granulantes y disgregantes, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina o goma arábiga, y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas para retardar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar de ese modo una acción sostenida a lo largo de un periodo más prolongado.
- 30
- 35

Las formulaciones para uso oral pueden ser cápsula de gelatina dura, en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín. Las cápsulas también pueden ser cápsulas de gelatina blanda, en las que el principio activo se mezcla con agua o disolventes miscibles tales como propilenglicol, PEG y etanol, o un medio de aceite, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las composiciones también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite. La fase aceitosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo, parafina líquida o mezclas de los mismos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser fosfátidos que se producen de manera natural, por ejemplo, semilla de soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitano, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, polioxietileno-monooleato de sorbitano. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes, agentes de amargor, agentes aromatizantes y conservantes.

Las suspensiones acuosas pueden contener el ácido β -resorcílico en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábica; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido que se produce de manera natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietilensorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de polietilensorbitano. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes, y uno o más agentes edulcorantes y/o agentes de amargor, tales como los expuestos anteriormente.

Los gránulos y polvos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ácido β -resorcílico en mezcla con un

agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados se muestran a modo de ejemplo mediante los ya mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, de amargor, aromatizantes y colorantes.

Pueden formularse jarabes y elixires con agentes edulcorantes, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Tales formulaciones también pueden contener un demulcente, un conservante, agente(s) aromatizante(s) y agente(s) colorante(s).

Las composiciones pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse según la técnica conocida usando los agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable desde el punto de vista parenteral, por ejemplo, como disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer y disolución isotónica de cloruro de sodio. También pueden usarse codisolventes tales como etanol, propilenglicol o polietilenglicoles. Pueden usarse conservantes, tales como fenol o alcohol bencílico.

Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como medio de suspensión o disolvente. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo insípido incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de productos inyectables.

Como vehículo o diluyente, las composiciones de la presente invención pueden incluir aceites vegetales tales como, pero sin limitarse a, aceite de semilla de soja, aceite de cacahuete, aceite de ricino, aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de oliva, aceite de semillas de uva, aceite de girasol, etc.; aceites minerales tales como, pero sin limitarse a, vaselina, parafina, silicona, etc.; hidrocarburos alifáticos o cíclicos o, alternativamente, por ejemplo, triglicéridos de cadena media (tales como C8-C12).

Las formas de dosificación pueden contener desde 0,5 mg hasta 10 g de ácido β -resorcílico. En una realización particular, la composición farmacéutica se administra por vía oral y el ácido β -resorcílico se encuentra a una dosis de entre 1 y 60 mg/kg de peso

corporal/día, preferentemente entre 15 y 60 mg/kg de peso corporal/día.

En una realización particular de la invención, la composición farmacéutica está caracterizada por un régimen de administración oral de entre 1 y 3 veces al día.

5

En una realización de la invención, el ácido β -resorcílico está presente en una composición veterinaria, farmacéutica o nutracéutica a una concentración del 0,05 al 100% en peso/peso, preferiblemente del 0,05 al 95%, del 0,05 al 90%, del 0,05 al 85%, del 0,05 al 80%, del 0,05 al 70%, del 0,05 al 60%, del 0,05 al 50%, del 0,05 al 40%, del 0,05 al 30%,
10 del 0,05 al 20% o del 0,05 al 10% en peso/peso.

En una realización particular, la composición farmacéutica está caracterizada porque es para su uso en mamíferos, preferiblemente humanos. Preferiblemente, los humanos pertenecen a una población con edad igual o superior a 30 años, igual o superior a 40 años,
15 preferiblemente igual o superior a 50 años.

Usos no terapéuticos

La presente invención también contempla la prevención de acumulación de tejido adiposo blanco o la reducción de tejido adiposo blanco en animales, preferiblemente mamíferos,
20 aún más preferiblemente humanos. En una realización preferida, en humanos que no sufran necesariamente una enfermedad asociada a un exceso de tejido adiposo blanco, como por ejemplo personas con un índice de masa corporal inferior a 25.

25 Así, en un tercer aspecto la invención se refiere al uso no terapéutico del ácido β -resorcílico, o sales del mismo, en la prevención de la acumulación de tejido adiposo blanco o reducción de tejido adiposo blanco.

El experto en la materia entenderá que todas las realizaciones particulares y preferidas
30 descritas arriba para los usos terapéuticos serán de aplicación a los usos no terapéuticos descritos en esta sección, siempre y cuando no sean incompatibles.

En una realización particular del tercer aspecto, el ácido β -resorcílico, o sales del mismo, se proporciona en una composición nutracéutica que comprende un excipiente
35 nutricionalmente aceptable. Preferiblemente, dicha composición nutracéutica es un alimento funcional, un producto dietético o un suplemento nutricional.

Composición nutracéutica

- Un cuarto aspecto de la invención va dirigido a una composición nutracéutica, que puede ser un alimento funcional, producto dietético o suplemento nutricional, que comprende ácido β -resorcílico, caracterizado en que el ácido β -resorcílico se encuentra en una concentración superior a 5% en p/p, preferiblemente superior a 10%, superior a 20%, superior a 30%, superior a 40%, superior a 50%, o superior a 60% en p/p.
- La expresión general "composición nutracéutica", que contempla "alimento funcional", "producto dietético" o "suplemento nutricional" o simplemente "alimento" se usa en el presente documento en un sentido amplio y abarca alimentos para seres humanos así como alimentos para animales (es decir, un pienso). Preferentemente, el alimento es para consumo humano. Dicho alimento puede estar en forma de una solución o como un sólido, dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Una composición nutracéutica se puede basar en leche o bebidas derivadas de la leche como yogur para beber o yogur habitual, cualquier otro tipo de bebida de yogur habitual, cualquier otro tipo de bebida, que incluye agua, zumo de frutas ácidas o bebidas aromatizadas con frutas adicionales que tienen un pH en el intervalo de 2 a 8, en forma de chocolate, helado, barritas nutritivas u cualquier alimento.

Ejemplos.

- A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la utilidad del ácido β -resorcílico (indicado en los ejemplos como β -RA) para reducción de tejido adiposo blanco (TAB) con preservación del contenido y función de la musculatura esquelética y, por tanto, para el tratamiento del sobrepeso y obesidad.
- Para los estudios se utilizaron ratones control de la cepa c57Bl6j bajo los protocolos aprobados por el comité de ética de experimentación animal de la Universidad de Granada y registrados por el órgano competente, la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible de la Junta de Andalucía, con referencia 18/02/2019/016 y 16/09/2019/153.

35

Los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar de 4-10 experimentos por grupo. Para comparar las diferencias entre los 3 grupos experimentales se llevó a cabo un análisis ANOVA de una vía con un post-test de Tukey. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. La curva de supervivencia se analizó a través de los test log-rank (Mantel-Cox) y Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Ejemplo 1 – Situación de sobrepeso – dieta estándar

En este ejemplo, cuyo objetivo fue la evaluación a largo plazo durante el proceso de envejecimiento, los animales se mantuvieron en una dieta estándar para roedores constituida mayoritariamente por carbohidratos (66% carbohidratos, 21% proteínas y 13% grasas como fuentes energéticas), siendo ratones que van acumulando grasa durante el envejecimiento, lo que mimetizaría una situación de sobrepeso asociada a la edad.

El tratamiento experimental se basó en la administración de β -RA en el pienso de comida a una concentración del 0,33 % (peso/peso), lo que representa una dosis de 0,25-0,75 g/kg de peso corporal/día.

Los ratones se pusieron en tratamiento tras el destete, a los 21 días de vida, manteniéndolo durante toda la vida de los animales. Los análisis se realizaron a los 18 meses de vida, salvo que se indique otra edad, tras 17 meses de tratamiento.

Ejemplo 2 – Situación de obesidad inducida - dieta alta en grasas y sacarosa

En este ejemplo, cuyo objetivo fue realizar una evaluación a corto plazo en un modelo de síndrome metabólico inducido, los animales se mantuvieron en una dieta alta en grasas y sacarosa ("high fat high sucrose"; HFHS) (32% carbohidratos, 14% proteínas y 54% grasas como fuentes energéticas), siendo ratones que experimentan una mayor ganancia de grasa que mimetizaría un estado de obesidad.

El tratamiento experimental se basó en la administración de β -RA en el pienso de comida a una concentración del 0,33 % (peso/peso), lo que representa una dosis de 0,25-0,75 g/kg de peso corporal/día.

Los ratones se pusieron en tratamiento a los dos meses de vida, manteniéndolo durante 4 meses. Los análisis se realizaron a los 6 meses de vida, tras 4 meses de tratamiento.

RESULTADOS**Ejemplo 3** – Cuantificación de niveles de β -RA en tejidos de ratones

5

En el ejemplo 1 se describe la administración de β -RA en el pienso de comida a una concentración del 0,33 % (peso/peso), lo que representa una dosis de 0,25-0,75 g/kg de peso corporal/día. Por tanto, el β -RA se ha administrado de forma crónica por vía oral.

10 La cuantificación del β -RA se llevó a cabo por HPLC-UV usando una columna Ultra Aqueous C18 y una fase móvil consistente en fosfato potásico 20 mM y acetonitrilo al 15% (pH 2.5). La curva estándar consistió en β -RA a una concentración de 5, 25 and 100 μ g /mL.

15 En este ejemplo, se determinaron los niveles de β -RA para conocer la biodisponibilidad del compuesto cuando se administra por vía oral. Se ha observado que el β -RA aparece en cerebro, riñones, hígado y músculo esquelético, siendo los riñones los tejidos que alcanzan el nivel más alto del compuesto (Tabla 1).

20 Tabla 1. Niveles de β -RA en ratones wild-type de 3 meses de edad tratados con β -RA incorporado en la dieta estándar a una concentración de 0,33 % (p/p).

Cerebro	Riñón	Hígado	Músculo
1,26 \pm 0,58	43,02 \pm 16,51	7,04 \pm 2,96	20,28 \pm 9,39

25 Datos expresados como la media \pm desviación estándar. Los resultados se expresaron en ng de β -RA/mg proteína. Los ratones sin tratar no presentaron niveles detectables de β -RA.

30 La composición ha mostrado ser eficaz empleando dosis de entre 0,25 y 0,75 g/kg de peso del ratón. Eso se podría corresponder a una dosis comprendida entre 20 y 60 mg/kg de peso en humanos según la fórmula de traslación de dosis basada en la superficie de área corporal (Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. FASEB J 22: 659-661). No obstante, atendiendo a Wang, Smith et al. (Wang Y, Smith C, Parboosingh JS, Khan A, Innes M, Hekimi S (2017) Pathogenicity of two COQ7 mutations and responses to 2,4-dihydroxybenzoate bypass treatment. J Cell Mol

Med 21: 2329-2343), también se podría predecir que una dosis entre 1 mg/kg peso corporal/día y 16 mg/kg peso corporal humano/día podría ser también efectiva.

Ejemplo 4 – Efecto del β -RA en Supervivencia y Estado Fenotípico de ratones con dieta estándar

5

La determinación de la supervivencia y el peso corporal se hizo a través de registros continuos durante la vida de los animales. La evaluación de la actividad y coordinación motora se hizo a través del test de rotarod. La fuerza muscular de las piernas traseras se hizo a través del test de fuerza de agarre. La imagen y el peso de los tejidos se tomaron

10

Tras la administración crónica de β -RA (ejemplo 1) se observó un aumento de la supervivencia en la etapa de vejez (18-24 meses) (Figuras 1 y 2) y una reducción del peso en todas las etapas del desarrollo (Figura 3A y 3B).

15

La reducción del peso corporal observada se debió exclusivamente a la reducción en la cantidad de grasa abdominal y visceral, manteniéndose el peso de la musculatura esquelética en el rango de normalidad (Figuras 4 y 5). De hecho, la función muscular, determinada como fuerza muscular de las piernas traseras permaneció inalterada e incluso ligeramente aumentada cuando se refiere al peso total del animal (Figura 6A-D). Asimismo, el test de coordinación motora ha demostrado una ligera tendencia al aumento de dicha capacidad en los ratones tratados con β -RA (Figura 7A-B).

20

Este ejemplo demuestra que el β -RA permite mejorar el estado de salud y prolongar la vida.

25

Ejemplo 5 – Efecto del β -RA en la Morfología hepática de ratones con dieta estándar

El sobrepeso u obesidad, los niveles altos en grasa, la resistencia a insulina y la hiperglucemia son factores frecuentemente asociados al envejecimiento que favorecen el depósito de grasas en el hígado, conocido como esteatosis hepática, que se manifiesta clínicamente como enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD).

30

En este ejemplo se han tomado fotos de los animales y de los tejidos tras su disección. Los tejidos se fijaron en formalina y se embebieron en parafina. Múltiples secciones (4 μ m de grosor) se desparafinaron con xileno y se tiñeron con la tinción de hematoxilina y eosina

35

(Luna-Sanchez M, Diaz-Casado E, Barca E, Tejada MA, Montilla-Garcia A, Cobos EJ, Escames G, Acuna-Castroviejo D, Quinzii CM, Lopez LC (2015) The clinical heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency results from genotypic differences in the Coq9 gene. EMBO Mol Med 7: 670-87). Los tejidos también se congelaron instantáneamente en isopentano enfriado en nitrógeno líquido (Luna-Sanchez M, Diaz-Casado E, Barca E, Tejada MA, Montilla-Garcia A, Cobos EJ, Escames G, Acuna-Castroviejo D, Quinzii CM, Lopez LC (2015) The clinical heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency results from genotypic differences in the Coq9 gene. EMBO Mol Med 7: 670-87). Múltiples secciones (8 mm de grosor) del tejido congelado se tiñeron con la tinción "Oil Red O". Las secciones se examinaron a magnificaciones de 40-400 x en un microscopio Nikon Eclipse Ni-U, y las imágenes se tomaron bajo las mismas condiciones de luz con el programa informático NIS-Elements Br.

Las tinciones histológicas permiten conocer los cambios morfológicos y contenido en grasa del hígado y tener así una estimación de la presencia o ausencia de gotas lipídicas (esteatosis hepática) características del hígado graso no alcohólico.

Los inventores han observado que los ratones wild-type con dieta estándar (ejemplo 1) presentan signos claros de esteatosis hepática a los 18 meses de edad, tanto en machos como en hembras, representado por la presencia de gotas lipídicas que dan señal intensa con la tinción "Oil Red O" (Figura 8A-F y Figura 9M-R). La aparición de dicha esteatosis hepática es prevenida por el tratamiento con β -RA, tanto en machos como en hembras (Figura 8G-L y figura 9S-Y).

El β -RA permite modificar el aspecto y contenido del tejido adiposo blanco (TAB).

Ejemplo 6 – Efecto del β -RA sobre el proteoma mitocondrial renal en ratones con dieta estándar

Para averiguar si el β -RA tiene efectos sobre el metabolismo energético en la mitocondria se hizo un estudio del proteoma mitocondrial en riñón, al ser este tejido el que alcanza mayores niveles de β -RA (ver Tabla 1).

Cada riñón se diseccionó y se procedió al aislamiento de la fracción mitocondrial por centrifugación diferencial. Cada pellet se resuspendió en 500 mL de medio HEENK con inhibidor de proteasas. Las muestras fueron lisadas, digeridas y tratadas previo a la

inyección en el UHPLC. Tras el control de calidad de las muestras, estas se inyectaron en un UHPLC 1290 system (Agilent Technologies; Santa Clara, USA) acoplado a un Q Exactive HF mass spectrometer (Thermo Scientific; Bremen, Germany) en las condiciones descritas previamente (Liu F, Lossi P, Rabbitts BM, Balaban RS, Heck AJR (2018) The interactome of intact mitochondria by cross-linking mass spectrometry provides evidence for coexisting respiratory supercomplexes. Mol Cell Proteomics 17: 216-232). Los archivos crudos generados se analizaron con el programa informático MaxQuant v1.6.10 (Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nat Biotechnol 26: 1367-72). Los archivos generados con MaxQuant se analizaron con Perseus: los datos LFQ se transformaron en log₂, y las identificaciones que estuvieron presentes en al menos 3 de las 5 réplicas se mantuvieron para los análisis siguientes. Para el volcano plot se ha establecido un umbral de valor de *P* de 0,01 y 1 para la diferencia en log₂ los valores LFQ.

Los inventores han observado que entre los cambios que el β -RA induce en el proteoma mitocondrial se encuentra un aumento de proteínas ligadas a las rutas metabólicas de producción de acetil-CoA desde el piruvato y del ciclo ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs (Figura 10), lo que podría contribuir a inducir un aumento en la movilización de sustratos como fuentes para producir energía.

20

Ejemplo 7 – Efecto del β -RA sobre la capacidad proliferativa de preadipocitos y mioblastos

Es conocido que uno de los mecanismos de expansión de TAB es la hiperplasia, es decir, la capacidad del TAB reclutar nuevos adipocitos que han proliferado a partir de células precursoras. Para averiguar si el efecto del β -RA sobre el TAB podría ser también una acción directa sobre el TAB, se determinó en ensayos *in vitro* la capacidad proliferativa de una línea celular de preadipocitos (3T3L1) sometida a tratamiento con β -RA y comparar los resultados con los obtenidos en una línea celular de mioblastos (C2C12). Con ello se podría determinar si los posibles efectos son específicos de un tipo celular concreto, excluyendo aquellas señales y consecuencias que derivan del contexto fisiológico de los estudios *in vivo*.

Las líneas celulares de preadipocitos 3T3L1 y mioblastos C2C12 fueron proporcionadas por el servicio de cultivos celulares del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Las células se cultivaron en DMEM-GlutaMAX rico en glucosa suplementado con 10 % de BCS o FBS, 1% de amino ácidos no esenciales MEM y 1% de

35

antibiótico/antimicótico. El tratamiento con β -RA se administró a una concentración de 1 mM durante 5 días. Se trató también un grupo control con vehículo (DMSO) a la misma concentración (Luna-Sanchez et al., 2015). El ensayo de proliferación se realizó con el Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (ThermoFisher Scientific), siguiendo las indicaciones de la empresa manufacturera.

Los inventores han observado que, in vitro, el β -RA induce una inhibición de la proliferación de preadipocitos 3T3L1 (Figura 11A), mientras que el mismo compuesto no ejerció un efecto significativo sobre la capacidad proliferativa de mioblastos C2C12 (Figura 11B).

Ejemplo 8 – Efecto del β -RA en Supervivencia y Estado Fenotípico de ratones con dieta alta en grasas y sacarosa

La determinación de la supervivencia y el peso corporal se hizo a través de registros continuos durante la vida de los animales. La evaluación de la actividad y coordinación motora se hizo a través del test de rotarod. La fuerza muscular de las piernas traseras se hizo a través del test de fuerza de agarre. La imagen y el peso de los tejidos se tomaron inmediatamente después del sacrificio y disección de los animales.

Tras la administración de β -RA a ratones con una dieta HFHS (ejemplo 2) se observó un aumento del peso de los ratones, comparado con los sometidos a una dieta estándar (ejemplo 4), y el suplemento con β -RA contrarrestó dicho aumento de peso (Figura 12A-B), exclusivamente debido a la reducción de grasa abdominal y visceral (Figura 12C-F). Asimismo, dichos cambios no producen cambios en la masa muscular esquelética (Figura 12G-J). Ello muestra que, independientemente de la dieta, sea esta más rica en carbohidratos, como en el ejemplo 1 (y ejemplo 4), o más rica de grasas como en el ejemplo 2 (y el presente ejemplo), el β -RA es capaz de prevenir la acumulación de grasa abdominal y visceral.

La dieta con β -RA permitió modificar el contenido cuantitativo de los tejidos, especialmente del tejido adiposo blanco (TAB), mejorar las funciones motoras y las funciones musculares.

En su conjunto, en la presente invención se describe una terapia consistente en el suministro de β -RA para reducción de TAB con preservación del contenido y función de la musculatura esquelética y, por tanto, de utilidad para su aplicación en sobrepeso y obesidad.

REIVINDICACIONES

1. Ácido β -resorcílico, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso en la prevención de la acumulación de tejido adiposo blanco o reducción de tejido adiposo blanco.
5
2. El ácido β -resorcílico para su uso según la reivindicación 1, caracterizado porque preserva el contenido en masa muscular esquelética.
- 10 3. El ácido β -resorcílico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque el uso es para la prevención y/o tratamiento del sobrepeso, de la obesidad, o de afecciones asociadas al síndrome metabólico, esteatosis, preferiblemente la esteatosis hepática, o acumulación de gotas lipídicas en el hígado o para la prevención de enfermedades del corazón, prevención de cáncer y de accidentes cerebrovasculares.
15
4. El ácido β -resorcílico para su uso según cualquier una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque es para su uso en mamíferos.
- 20 5. El ácido β -resorcílico para su uso según cualquier una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque es para su uso en humanos.
6. El ácido β -resorcílico para su uso según la reivindicación 5, caracterizado porque los humanos pertenecen a una población con edad igual o superior a 30 años, igual o superior a 40 años, preferiblemente igual o superior a 50 años.
25
7. Composición farmacéutica que comprende ácido β -resorcílico, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en la prevención de la acumulación de tejido adiposo blanco o reducción de tejido adiposo blanco.
30
8. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7, caracterizada porque preserva el contenido en masa muscular esquelética.
- 35 9. Composición farmacéutica para su uso según cualquier una de las reivindicaciones 7 u 8, caracterizada porque el uso es para la prevención y/o tratamiento del

sobrepeso, de la obesidad, o de afecciones asociadas al síndrome metabólico, esteatosis, preferiblemente la esteatosis hepática, o acumulación de gotas lipídicas en el hígado o para la prevención de enfermedades del corazón, prevención de cáncer y de accidentes cerebrovasculares.

5

10. Composición farmacéutica para su uso según cualquier una de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizada porque es para su uso en mamíferos.

10

11. Composición farmacéutica para su uso según cualquier una de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizado porque es para su uso en humanos.

12. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, caracterizado porque los humanos pertenecen a una población con edad igual o superior a 30 años, igual o superior a 40 años, preferiblemente igual o superior a 50 años.

15

13. Composición farmacéutica para su uso según cualquier una de las reivindicaciones 7 a 12, caracterizada porque es una composición farmacéutica de administración oral.

20

14. Composición farmacéutica para su uso según cualquier una de las reivindicaciones 7 a 13, caracterizada porque se administra por vía oral en donde el ácido β -resorcílico se encuentra a una dosis de entre 1 y 60 mg/kg de peso corporal/día, preferentemente entre 15 y 60 mg/kg de peso corporal/día.

25

15. Composición farmacéutica para su uso según cualquier una de las reivindicaciones 7 a 14, caracterizada por un régimen de administración oral de entre 1 y 3 veces al día.

30

16. Uso no terapéutico del ácido β -resorcílico, o sales del mismo, en la prevención de la acumulación de tejido adiposo blanco o reducción de tejido adiposo blanco.

17. Uso no terapéutico según la reivindicación 16, caracterizado porque preserva el contenido en masa muscular esquelética.

35

18. Uso no terapéutico según cualquier una de las reivindicaciones 16 o 17, caracterizado porque el uso es para la prevención y/o reducción del sobrepeso y/o

obesidad.

19. Uso no terapéutico según cualquier una de las reivindicaciones 16 a 18, caracterizado porque es para su uso en mamíferos.

5

20. Uso no terapéutico según cualquier una de las reivindicaciones 16 a 19, caracterizado porque es para su uso en humanos.

10

21. Uso no terapéutico según la reivindicación 20, caracterizado porque los humanos pertenecen a una población con edad igual o superior a 30 años, igual o superior a 40 años, preferiblemente igual o superior a 50 años.

15

22. Uso no terapéutico según cualquier una de las reivindicaciones 16 a 21, caracterizado porque el ácido β -resorcílico, o sales del mismo, se proporciona en una composición nutracéutica que comprende un excipiente nutricionalmente aceptable.

20

23. Uso no terapéutico según la reivindicación 22, caracterizado porque la composición nutracéutica es un alimento funcional, un producto dietético o un suplemento nutricional.

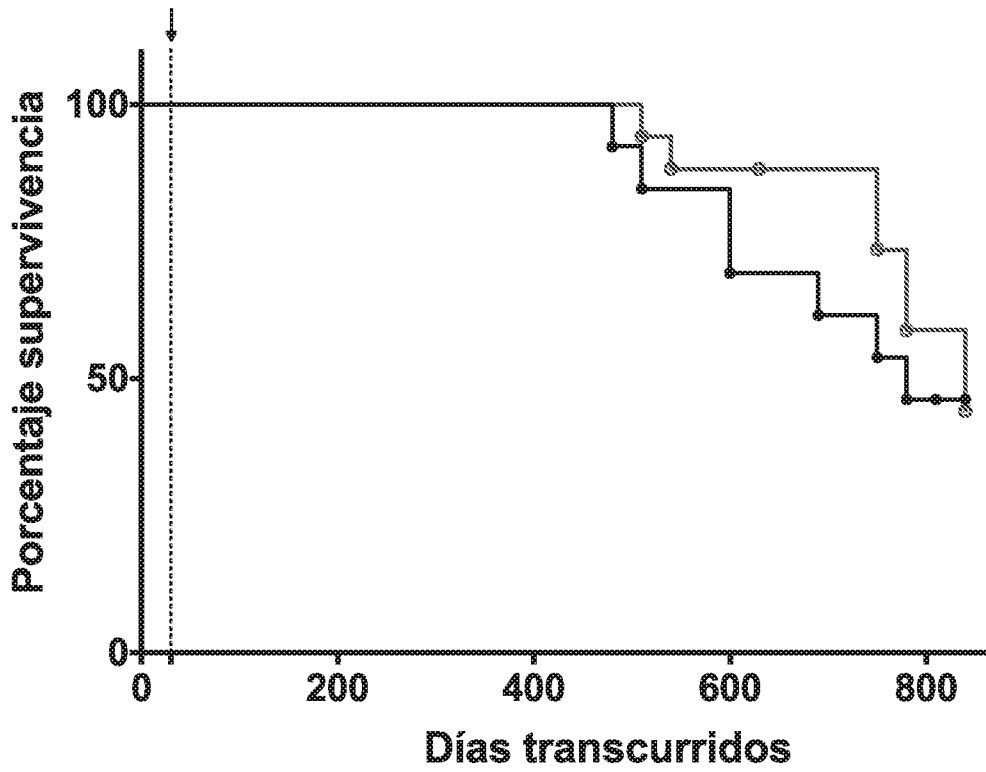


Figura 1

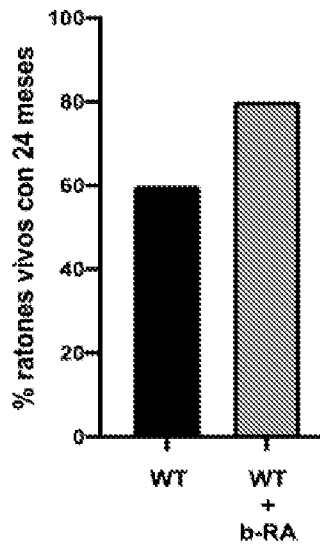


Figura 2

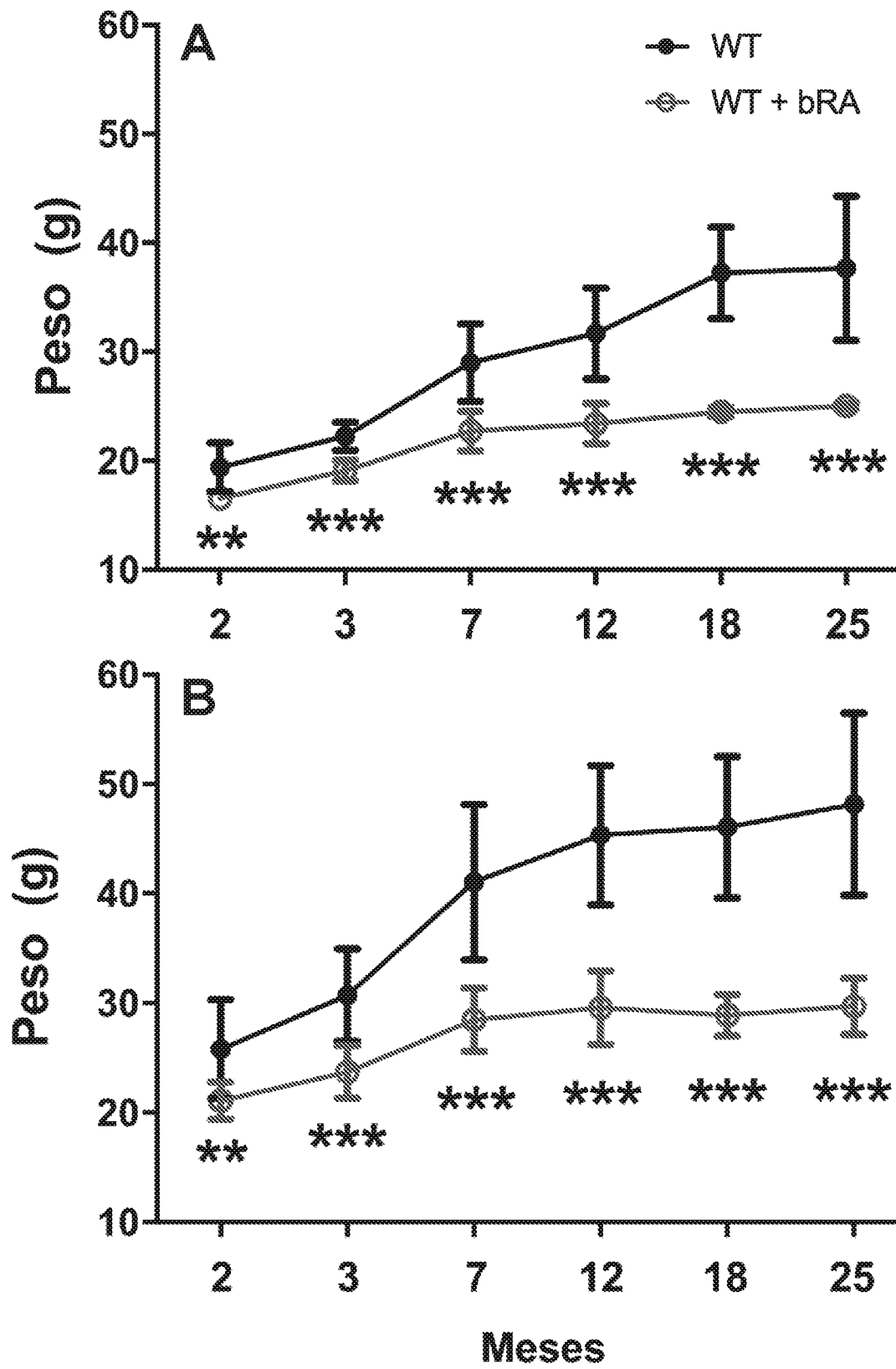


Figura 3

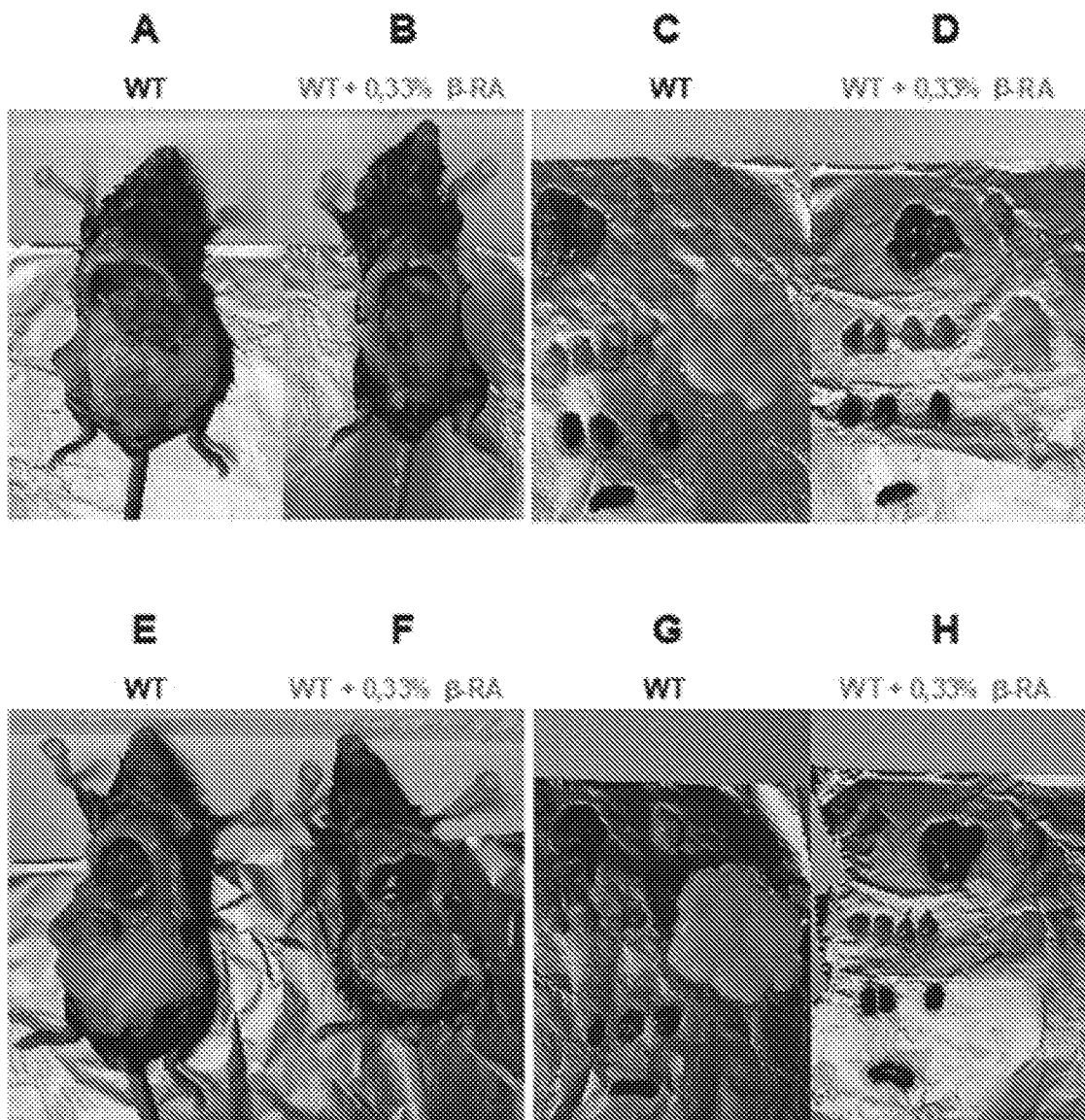


Figura 4

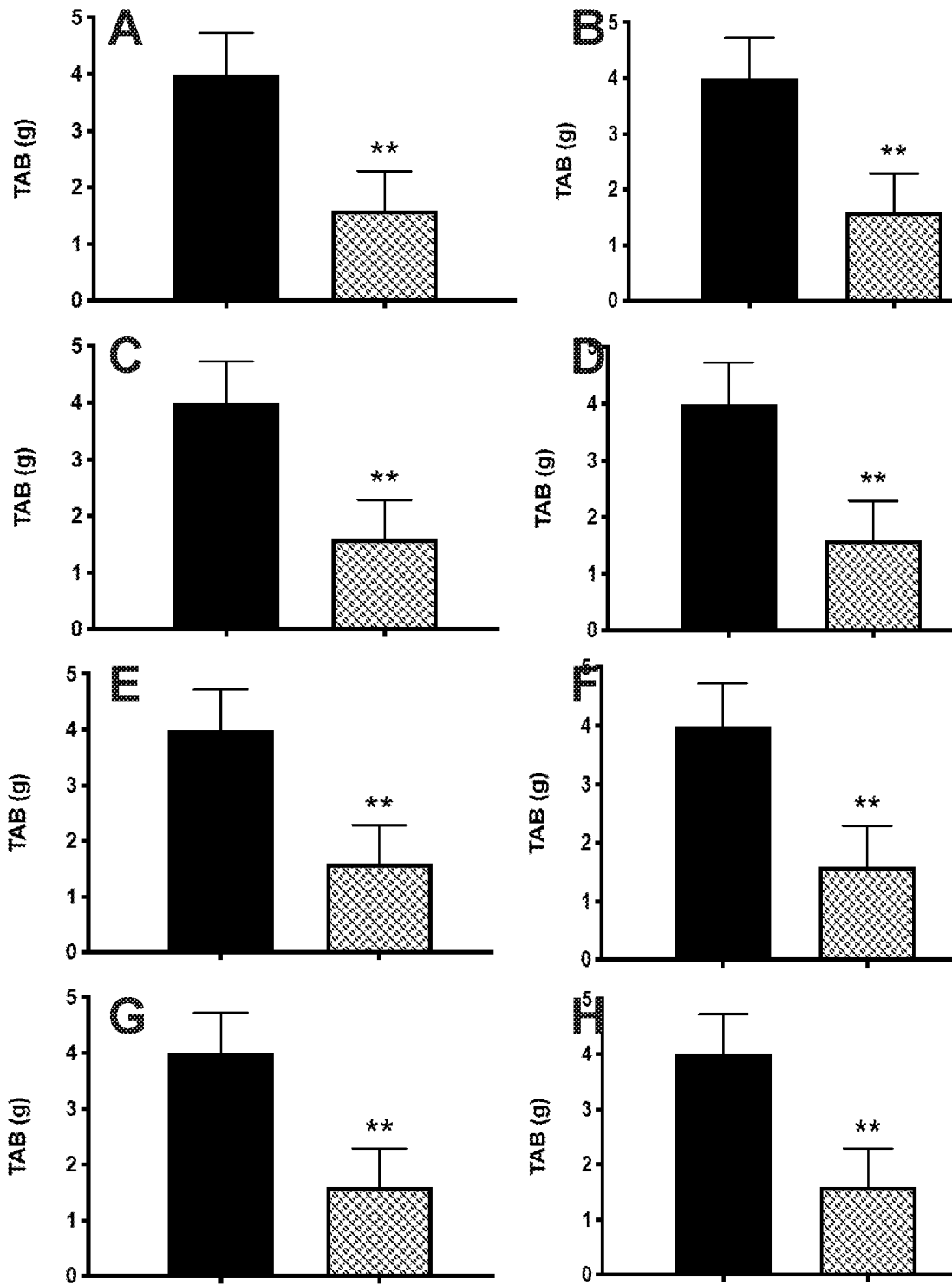


Figura 5

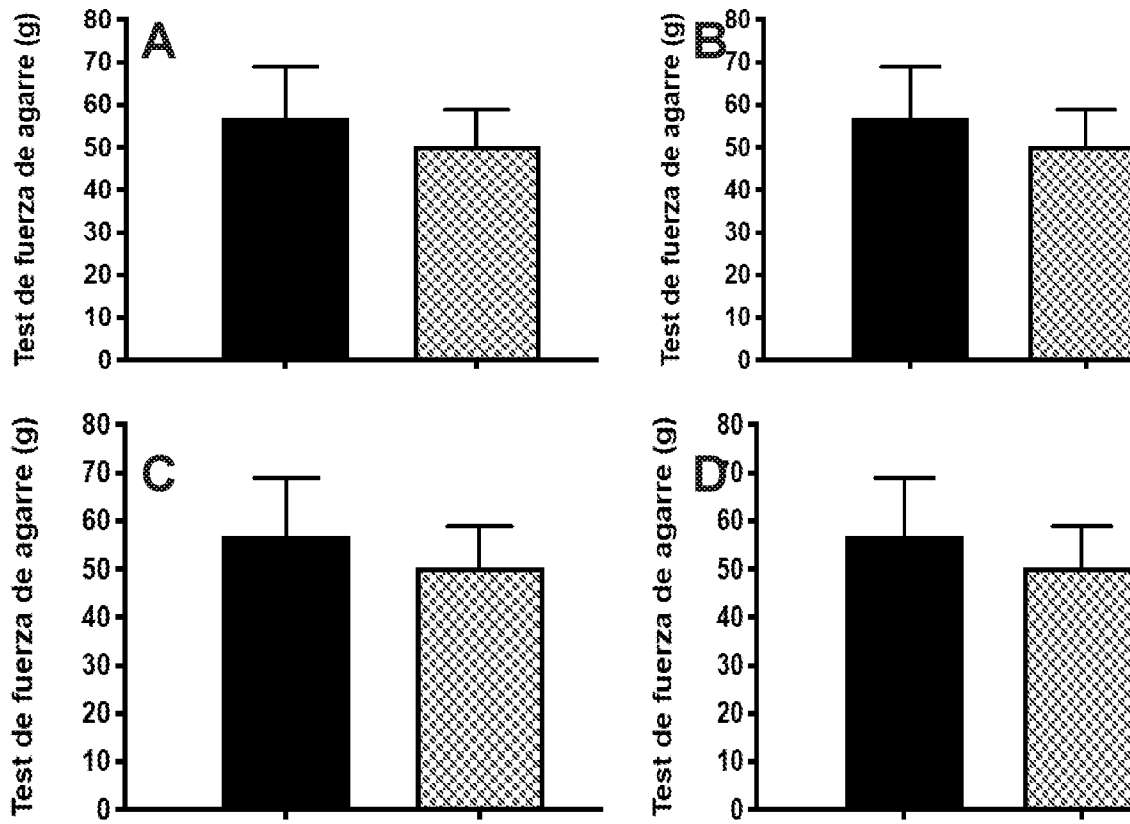


Figura 6

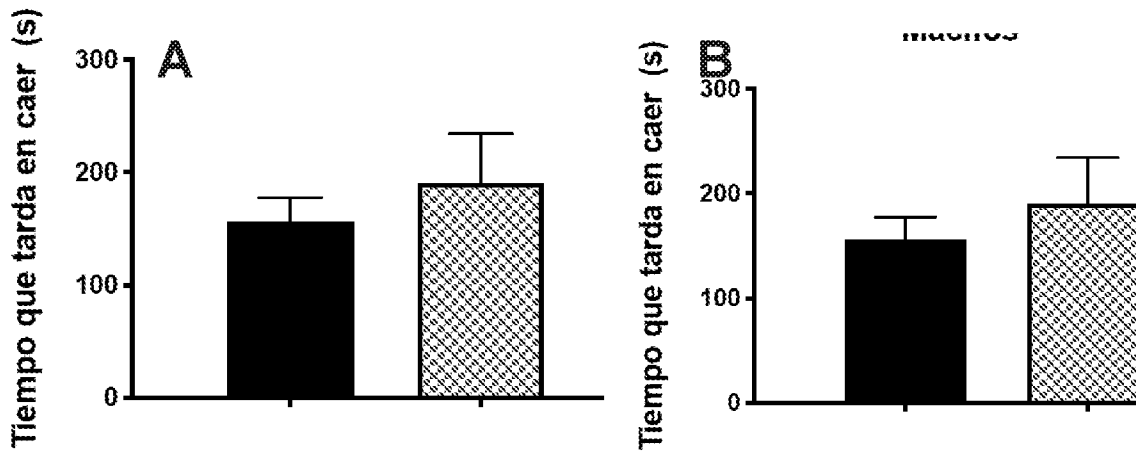


Figura 7

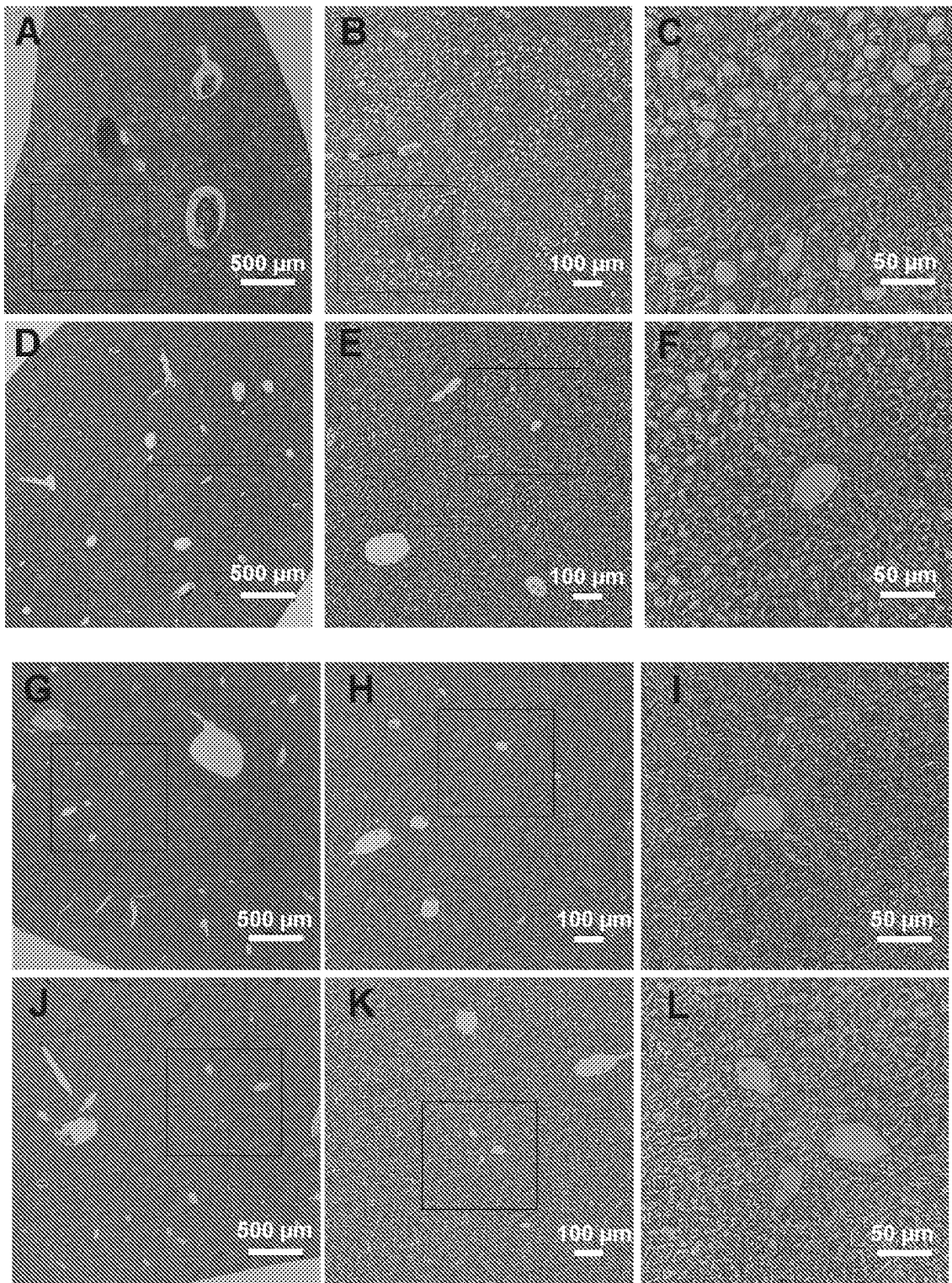


Figura 8

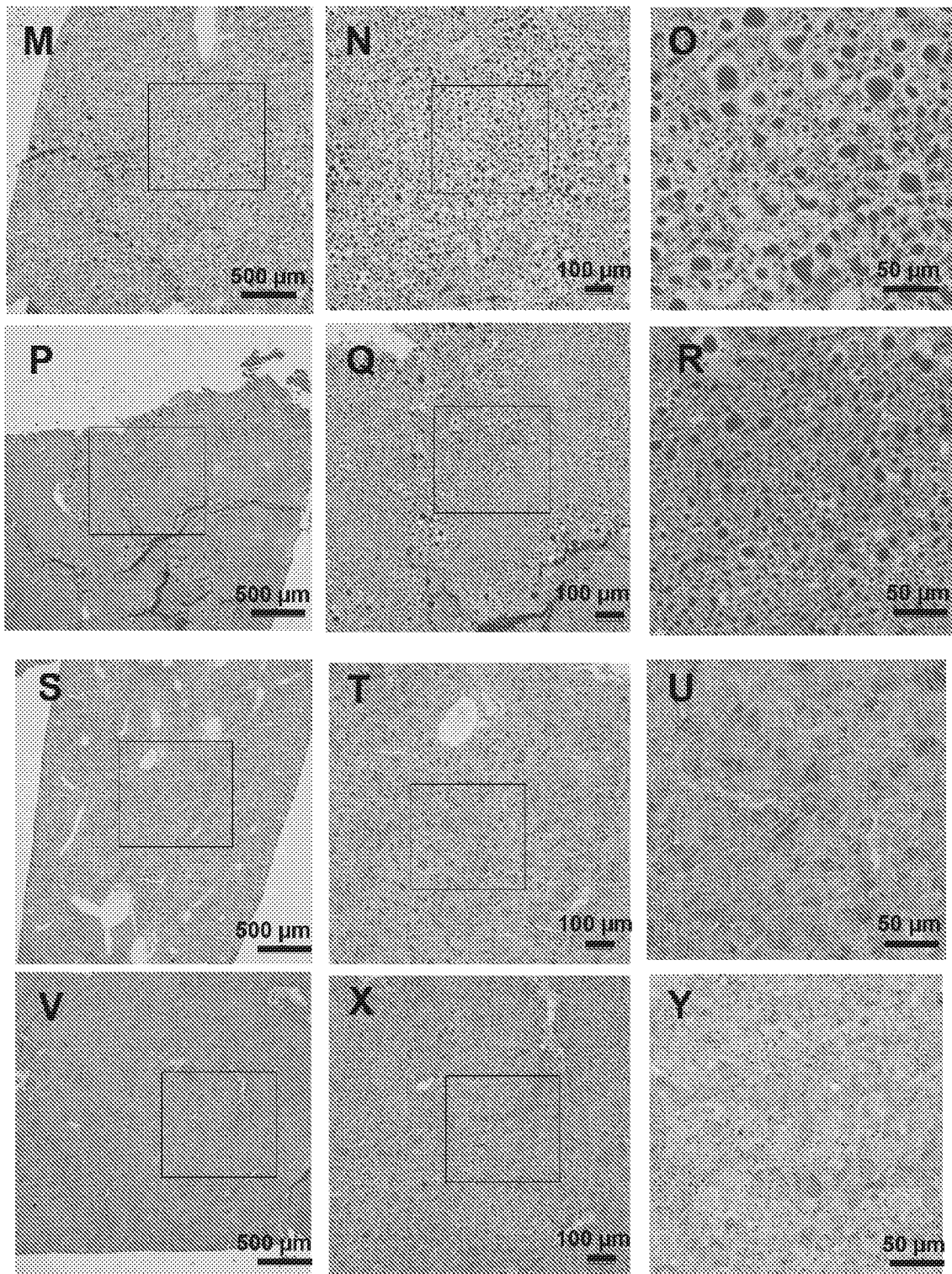


Figura 9

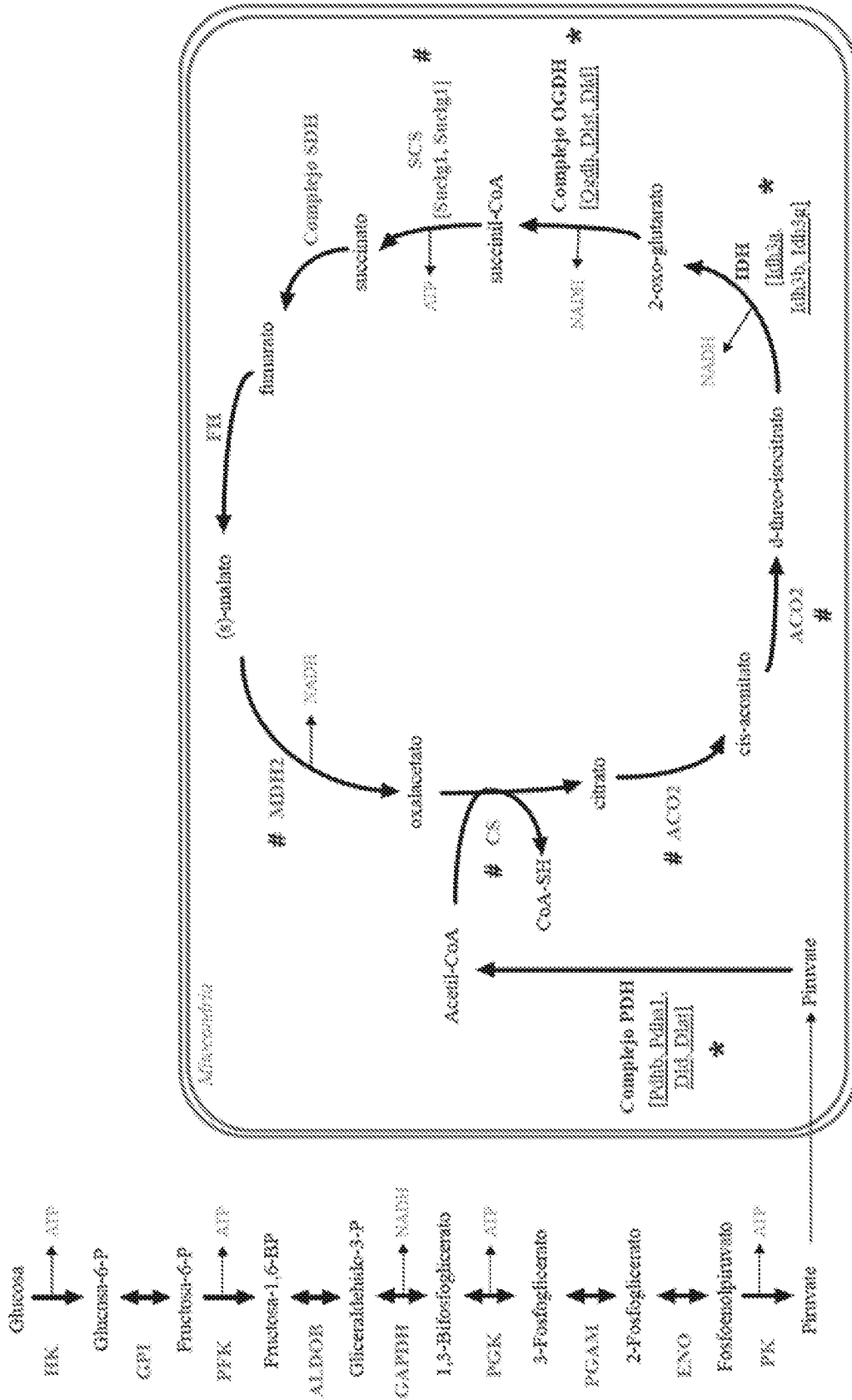


Figura 10

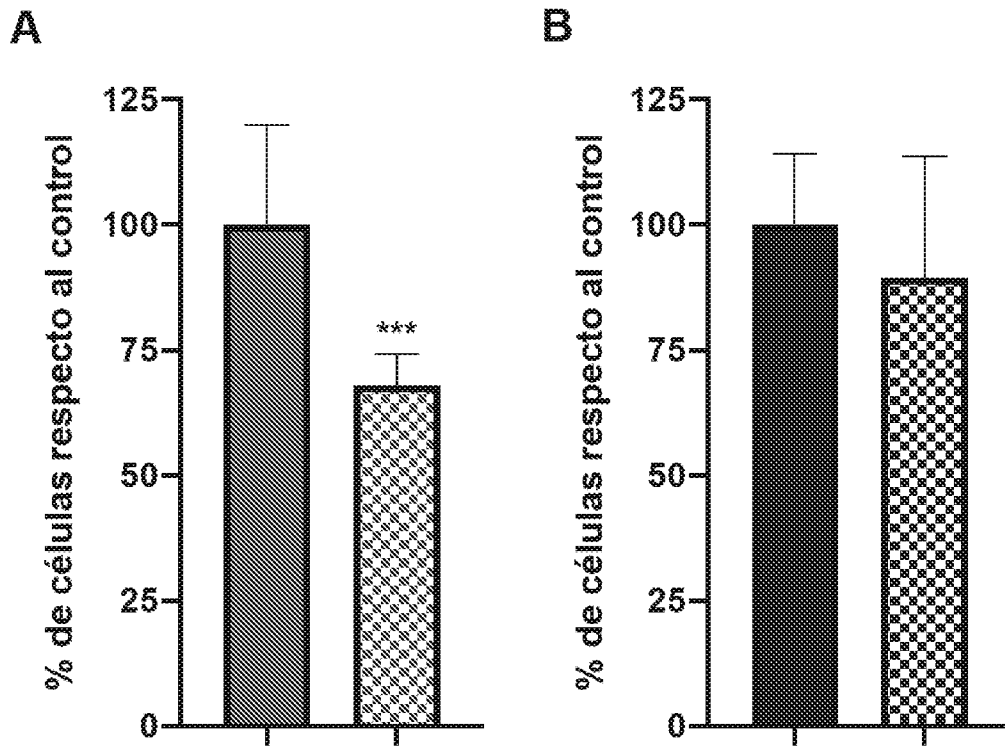


Figura 11

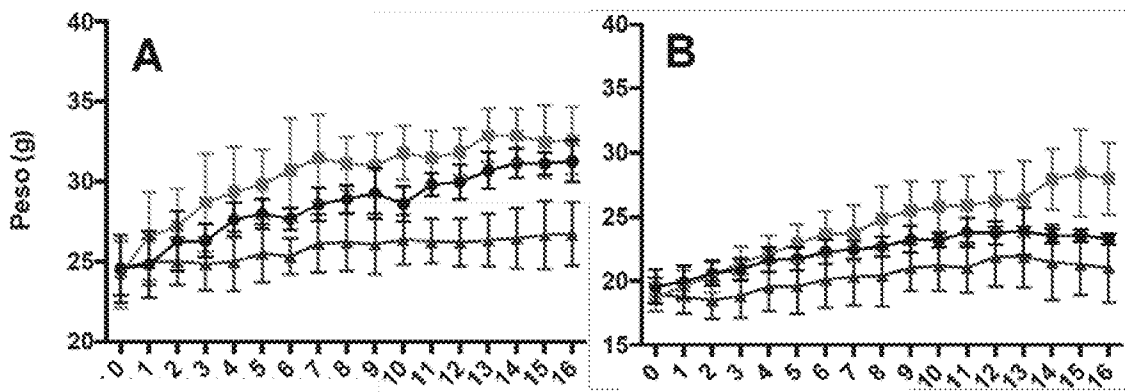


Figura 12

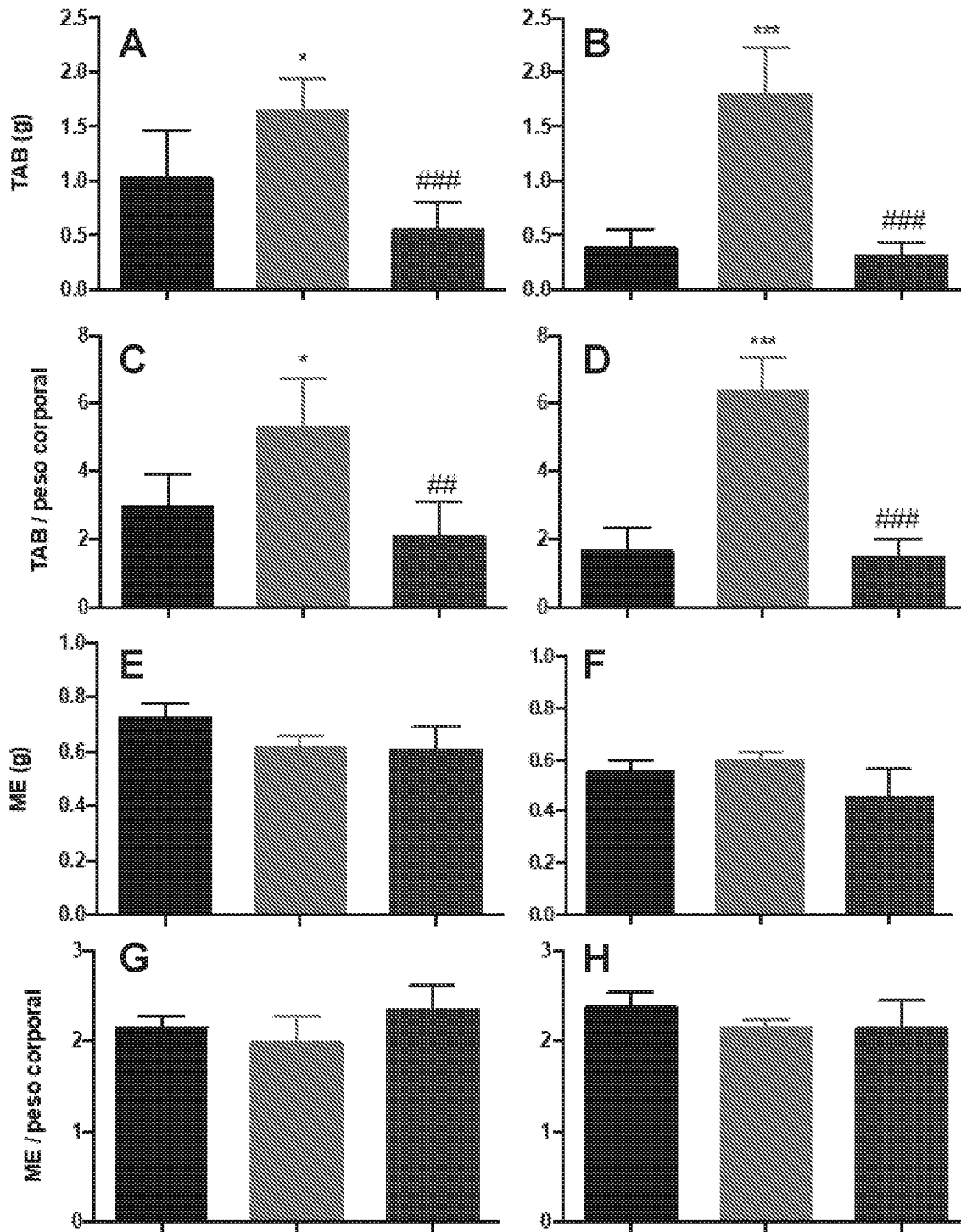


Figura 13