(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 662 700**

(51) Int. CI.:

A61K 31/357 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2008 E 11005445 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2392326**

(54) Título: **Componente de silibinina para el tratamiento de la hepatitis**

(30) Prioridad:

15.11.2007 EP 07022187
15.11.2007 US 988168 P
25.03.2008 EP 08005459

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2018

(73) Titular/es:

MADAUS GMBH (100.0%)
Colonia-Allee 15
51067 Köln, DE

(72) Inventor/es:

FERENCI, PETER, DR.;
MENGS, ULRICH, DR.;
POHL, RALF-TORSTEN, DR.;
ROVATI, LUCIO CLAUDIO y
D'AMATO, MASSIMO MARIA

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

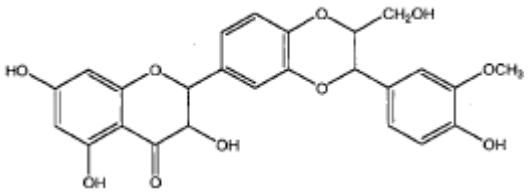
DESCRIPCIÓN

Componente de silibinina para el tratamiento de la hepatitis

Esta invención se refiere al uso de un componente de silibinina para la producción de un medicamento para el tratamiento de la hepatitis C, en particular, para la reducción de la carga del virus. Preferiblemente, el medicamento está adaptado para una administración parenteral. Preferiblemente, el componente de silibinina es un éster de silibinina.

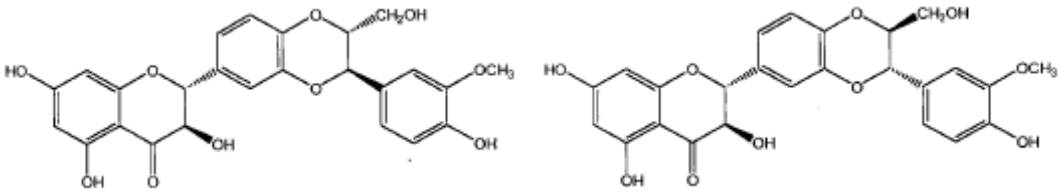
La silibinina, {3,5,7-trihidroxi-2-(3-(3-hidroxi-4-metoxi-fenil)-2-(hidroximetil)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]-dioxin-6-il)croman-4-ona; o según la Ph. Eur. {(2R,3R)-3,5,7-trihidroxi-2-[(2R,3R)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-(hidroximetil)-2,3-dihidro-1,4-benzo-dioxin-6-il]-2,3-dihidro-4H-1-benzopiran-4-ona} es el constituyente principal de la silimarina y el flavonoide principal extraído del cardo lechoso (Silybum marianum Gaertneri).

La silibinina tiene la siguiente estructura:



silibinina

Los diastereómeros silibinina A y silibinina B son distinguidos en la bibliografía:



silibinina A silibinina B

La silibinina es el constituyente principal de la silimarina (en una mezcla 50:50 de silibinina A y silibinina B). Otros constituyentes incluyen isosilibinina (isosilibinina A e isosilibinina B), silidianina (silydianina), silicristina (silycristina), isosilicristina, taxifolina y otros. Los métodos para aislar silibinina son conocidos a partir de la técnica anterior (por ejemplo, documento US 4.871.763).

La silibinina y la silimarina han sido investigadas y descritas en detalle. A este respecto, se puede hacer referencia, por ejemplo, a la publicación de N-C Kim *et al.*, Org. Biomol. Chem. 2003, 1, 1684-9; DYW Lee *et al.*, J. Nat. Prod. 2003, 66, 1171-4; DJ Kroll *et al.*, Integrative Cancer Therapies, 2007, 6, 110-9; Z Wen *et al.,* DMD Fast Forward, doi: 10.1124/dmd.107.017566; y documento US 4.871.763.

El *Silybum marianum* tiene un historial como planta médica desde hace casi 2 milenios. La silimarina, el extracto de semillas del cardo lechoso, es un antiguo remedio herbal usado para tratar una gama de trastornos del hígado y la vesícula biliar, que incluyen hepatitis, cirrosis y como un protector hepático contra el envenenamiento a partir de setas silvestres, alcohol, productos químicos y toxinas del medioambiente El modo de acción de la silimarina es diverso. El mayor ensayo controlado aleatorio realizado en los años 70 indicó que el tratamiento a largo plazo con silimarina puede disminuir la mortalidad en los pacientes de cirrosis (P Ferenci *et al.,* J Hepatol 1989, 9, 105-13). No obstante, la función del fármaco para el tratamiento de enfermedades del hígado sigue siendo controvertido (S Verma *et al.*, Clinical Gastroenterology and Hepatology 2007, 5, 408-16; F Rainone, Am Fam Phys 2005, 72(7), 1285-8). Parte de esta incertidumbre es debida a los datos limitados sobre sus regímenes farmacocinéticos y de dosificaciones óptimas. La silimarina es escasamente soluble en agua y las preparaciones orales tienen una biodisponibilidad limitada.

Las aplicaciones farmacéuticas de la silibinina son también conocidas. La silibinina tiene propiedades antioxidativas fuertes (véanse las publicaciones de A Pietrangelo *et al.,* Gastroenterology 1995, 109, 1941-49; MI Lucena *et al.*, Int J Clin Pharmacol Ther 2002, 40, 2-8; y L Mira *et al.*, Biochem Pharmacol 1994, 48, 753-9) y propiedades antifibróticas (véanse las publicaciones de G Boigk *et al.*, Hepatology 1987, 26, 643-9; y C Dehmlow *et a*l., Hepatology 1996, 23, 749-54) que hacen que sea un fármaco potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades hepáticas crónicas. La silibinina como sustancia pura es administrada por vía intravenosa, por ejemplo, en el caso del envenenamiento hepático por la taza blanca de la muerte (amanitina, faloidina) con el

fin de preservar el hígado de un deterioro adicional (véase la publicación de K Hruby *et al.*, Hum Toxicol 1983, 2, 138-195). El efecto sobre el envenenamiento por setas está explicado en parte por la estimulación de polimerasa nucleolar A que aumenta la síntesis de proteínas ribosomales e inhibe la peroxidación de lípidos (véase la publicación de J Sonnenbichler *et al.*, Prog Clin Biol Res. 1986, 213, 319-31). Los ensayos clínicos muestran también el éxito en la prevención y tratamiento de ciertos tipos de cáncer (L Varghese *et al.* Clin Cancer Res 2005, 11(23), 8441-7; K Letschert *et al.*, Toxicological Sciences 2006, 91, 140-9).

El éster de silibinina es comercializado en forma de una solución para infusión, por ejemplo, bajo la denominación Legalon® SIL en la Alemania.

La hepatitis viral se refiere a infecciones que afectan al hígado y están causadas por virus. Es un asunto de sanidad pública principal en todo el mundo. La hepatitis viral no implica solamente una elevada mortalidad, sino que también afecta a los recursos médicos y puede tener graves consecuencias económicas. La mayoría de los casos de hepatitis viral pueden ser prevenidos.

La hepatitis viral incluye cinco tipos de enfermedad, que pueden estar provocadas por al menos cinco virus diferentes. La hepatitis A y la hepatitis B (hepatitis viral y sérica, respectivamente) son enfermedades separadas y ambas pueden ser diagnosticadas mediante un ensayo serológico específico. La hepatitis C y E comprenden una tercera categoría, cada una de tipo distinto, siendo transmitida la hepatitis C por vía parenteral y la hepatitis E es transmitida por vía enteral. La hepatitis D, o hepatitis delta, es otro virus distinto y depende de la infección de hepatitis B. Esta forma de hepatitis se puede producir como una superinfección en un portador de hepatitis B o como una coinfección en un individuo con hepatitis B aguda.

La hepatitis C es una enfermedad infecciosa en seres humanos, que está provocada por el virus de la hepatitis C (HCV). La infección por HCV puede conducir en su transcurso a un deterioro grave del hígado, por ejemplo, inflamación del parénquima hepático, fibrosis del hígado, cirrosis del hígado y carcinoma del hígado. En más de un 80% de los pacientes infectados, la infección de HCV se hace crónica. La transmisión del HCV tiene lugar habitualmente por vía parenteral a través de la sangre.

Se estima que aproximadamente 170 millones de personas en todo el mundo están infectados con el virus de la hepatitis C (HCV). Los pacientes infectados pueden estar asintomáticos durante décadas hasta que finalmente se produce el desarrollo de la cirrosis del hígado y/o carcinomas hepatocelulares. Aproximadamente un 40-50% de los trasplantes de hígados en los Estados Unidos están basados en infecciones de HCV. Han sido identificados seis genotipos de HCV (HCV1-HCV6) que difieren en su extensión geográfica y en su respuesta a terapias medicinales.

Las proteínas del HCV se ha mostrado que inducen la activación de STAT-3 a través de tensión oxidativa y señalización de Ca^{2+} (K Koike *et al.*, Hepatol Res 2006; 34: 65-73; G Waris *et al.*, J Virol 2005, 79, 1569-80) así como de productos de peroxidación de lípidos y expresión de genes antioxidantes (M Okuda *et al.*, Gastroenterology 2002, 122, 366-375). Parece que el equilibrio de las capacidades potenciales oxidativa y reductora en la célula (estado redox celular) tiene consecuencias profundas sobre las trayectorias de transducción de señales (YM Janssen *et al.*, Am J Physiol 1997, 273:789-96) que incluyen señalización IFN-alfa impedida (D Di Bona *et al.*, J Hepatol. 2006, 45, 271-9).

La infección por HCV se divide según ICD10 (WHO, versión 2007) en hepatitis C aguda (B17.1) y crónica (B18.2).

El HCV es una de las causas más importantes de los desarrollos de hepatitis aguda y crónica. El curso clínico de la enfermedad, sin embargo, puede ser muy diferente y estar sujeto a una amplia variabilidad. Por tanto, no es posible hablar sobre un curso típico de la enfermedad, ya que la infección por HCV se manifiesta esencialmente mediante un espectro clínico amplio, es decir, por síntomas variables, panoramas clínicos diferentes y enfermedades secundarias hepáticas y extrahepáticas variables.

En aproximadamente un 20% de los pacientes con hepatitis aguda, la inflamación del hígado es atribuida a una infección por HCV. En la fase aguda, sin embargo, la hepatitis C habitualmente procede de forma asintomática y, por lo tanto, no es diagnosticada en aproximadamente un 85% de los casos. En algunos casos, solamente se producen síntomas no específicos de un síndrome de tipo falsamente gripal. Habitualmente, la infección se manifiesta durante la fase aguda.

La hepatitis C se hace crónica en aproximadamente un 85% de los pacientes con una infección de HCV aguda. Esta elevada tasa de cronificación parece que es el resultado de la amplia variabilidad de virus de HCV; es decir, el gen que codifica la capa del HCV es sometido a una elevada tasa de mutación. Debido a la elevada variabilidad del virus y, en particular, la elevada variabilidad del epítopo antigénico del HCV, el HCV mutado escapa al reconocimiento por el sistema inmune humano. El aproximadamente un 25% de los pacientes, como resultado de la inflamación crónica del hígado se produce la formación de cirrosis del hígado con un riesgo aumentado de desarrollo de carcinoma del hígado (véanse, por ejemplo, las publicaciones de J. H. Hoofnagle, Hepatology 1997, 26, Suppl. 1, 15S-20S; M. I. Memon *et al.*, Journal of Viral Hepatitis 2002, 9, 84-100; S. L. Tan *et al.*, Nature Reviews, Drug Discovery 2002, 1, 867-81).

Los pacientes que están infectados con HCV reciben habitualmente una terapia de combinación estándar medicinal

que consiste en interferón-α2a o interferón-α2b pegilados y ribavirina. En infecciones de HCV debidas al genotipo 2 o 3 (infecciones de HCV2 o HCV3), esta terapia de combinación se lleva a cabo durante 24 horas. En pacientes positivos a HCV1 de infecciones de HCV debidas al genotipo 1 (HCV1) la terapia de combinación se lleva a cabo durante 48 horas. Sin embargo, muchos de los pacientes infectados por HCV, sin embargo, interrumpen el tratamiento debido a los efectos secundarios que se producen y/o al bajo cumplimiento como consecuencia de la administración parenteral y el periodo de tratamiento prolongado. Además, solo aproximadamente un 50% de los pacientes que tienen infección de HCV1 consiguen un resultado del tratamiento de larga duración, es decir, el resto no responde (véase, por ejemplo, la publicación de RET Smith, Nature Reviews, Drug Discovery, 2006, 5, 715). La terapia de interferón pegilado más ribavirina para el virus de la hepatitis C falla en aproximadamente la mitad de los pacientes del genotipo 1. El fallo del tratamiento se produce por una ausencia de respuesta (disminución mínima de la titulación viral) o recaída (respuestas iniciales considerables seguidas de rebotes de los títulos virales durante la terapia o con posterioridad). Estos modelos diferentes podrían estar afectados por muchos factores que incluyen las características genéticas del hospedante, respuesta inmune y diferencias genéticas virales (véanse las publicaciones de MW Fried *et al.*, New England Journal of Medicine 2002, 347, 975-82; HS Conjeevaram *et al.*, Gastroenterology 2006, 131, 470-7; MP Manns *et al.*, Lancet 2001, 358, 958-65; DB Strader *et al.*, Hepatology 2004, 39, 114771; SJ Hadziyannis *et al.*, Ann Intern Med, 2004, 140, 346-55). Las diferencias genéticas virales podrían incluir diferencias previas a la terapia o diferencias que surgen durante el tratamiento debidas a la evolución viral en respuesta a las presiones aplicadas por la terapia.

Están siendo desarrollados nuevos tratamientos, que incluyen la optimización del tratamiento estándar actual con peginterferon más ribavirina, terapia antiviral específicamente dirigida a diana para HCV, nuevos agentes inmunomoduladores y tratamientos dirigidos a reducir la fibrosis (véase R.E. Stauber *et al.,* Drugs 2008, 68(10), 1347).

Hasta el día de hoy, no se puede obtener ninguna vacuna contra el HCV. Las terapias estándares medicinales son muy caras, muestran tan solo un éxito reducido en el control de la infección de HCV y a veces provocan efectos secundarios considerables (S. L. Tan *et al.*, Nature Reviews, Drug Discovery 2002, 1, 867; R. Bartenschlager, *ibid.* 911).

Hay una necesidad de medicamentos para el tratamiento de la hepatitis viral, en particular la hepatitis B y C.

Es un objeto de la invención hacer disponible un medicamento para el tratamiento de la hepatitis viral, en particular la hepatitis C, que tenga ventajas en comparación con los medicamentos de la técnica anterior. El medicamento, si es posible, debe tener efectos secundarios nulos o solo ligeros y ser eficaz, por ejemplo, en pacientes de hepatitis C que no responden suficientemente a la terapia de combinación convencional con PEG interferón/ribavirina. Además, el medicamento debe tener propiedades antivirales considerables y, por tanto, disminuir la carga de virus de forma duradera.

Este objetivo se consigue mediante el contenido objeto de las reivindicaciones de la patente.

Sorprendentemente se ha descubierto que la silibinina, sus sales y/o derivados farmacéuticamente tolerables son adecuados en el tratamiento de enfermedades hepáticas virales inflamatorias, en particular, la hepatitis C. Por tanto, los pacientes de hepatitis C que no responden (es decir, son los denominados “no sensibles”) a una terapia de combinación inmunomoduladora/antiviral como PEG interferón/ribavirina, que representa actualmente el tratamiento estándar para la hepatitis C, se puede conseguir una reducción significativa de la carga viral mediante la administración, Preferiblemente mediante la administración parenteral de un componente de silibinina. Adicionalmente, parece que el pretratamiento con el componente de silibinina mejora la respuesta de los pacientes a la posterior administración de interferón y ribavirina.

Las investigaciones relativas al tratamiento de infecciones de HCV, particularmente para la inhibición de infecciones de HCV mediante la administración de silimarina han sido descritas en la técnica anterior (véanse, por ejemplo, las publicaciones de R. Saller *et al*., Drugs 2001, 61(14), 2035-63; K. E. Mayer *et al*., Journal of Viral Hepatitis, 2005, 12, 559-67; documento US2005/0123628; S. J. Polyak *et al*., Gastro-enterology 2007, 132, 1925-1936).

R. Saller *et al.* informan que, aunque la silimarina no se conoce que afecte a la replicación viral, desde una perspectiva farmacológica se puede esperar que inhiba la cascada inflamatoria y citotóxica de acontecimientos activados por la infección viral. La administración oral de un complejo de silibinina-fosfatidilcolina (IdB1016, 240 mg de silibinina dos veces al día) en un estudio piloto controlado con placebo a corto plazo en 20 pacientes con hepatitis activa crónica puso de manifiesto que la evolución de los niveles de AST se redujo significativamente en el grupo de silibinina, sin diferencias congruentes en los demás ensayos de funciones virales (véanse las publicaciones de A. Vailati *et al.*, Fitoterapia, Volumen LXIV, No. 3, 1993; G. Buzzelli *et al.*, Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 1993, 31, 456-60).

K. E. Mayer *et al.* describen que el tratamiento oral de silimarina dio lugar a una disminución de las transaminasas en suero en comparación con la referencia en cuatro estudios y en comparación con el placebo en solamente un estudio. Sin embargo, no hay evidencia de que la silimarina afecte a la carga viral o mejore la histología hepática en

la hepatitis B o C (véanse las publicaciones de M.L. Chavez, J. Herb. Pharmacother. 2001, 1(3), 79-90; L.B. Seeff *et al.,* Hepatology, 2001, 34(3), 595-603). Los autores concluyen que los compuestos de silimarina probablemente disminuyen las transaminasas en suero en pacientes con hepatitis viral crónica, pero no parece que afecten a la carga viral o la histología hepática.

El documento US2005/0123628 se refiere, entre otras cosas, a la preparación y administración oral de composiciones que comprenden glicirricina, schisandra, ácido ascórbico, L-glutatión, silimarina, ácido lipoico y D-alfa-tocoferol. Estas composiciones se dice que son útiles para reducir la tensión oxidativa y la peroxidación de lípidos y para tratar enfermedades hepáticas crónicas, infección de virus de la hepatitis C crónica y esteatohepatitis no alcohólica. Numerosos estudios han informado de los efectos hepatoprotectores que la silimarina tiene contra una amplia diversidad de toxinas que incluyen acetaminofeno, etanol, tetracloruro de carbono y D-galactosamina y contra una lesión isquémica, radiación y toxicidad por hierro. Durante las veinte primeras semanas de un ensayo en un centro clínico abierto y aleatorio, se suministró a los sujetos una administración oral dos veces al día de un total de 1.000 mg de glicirricina; tres veces al día de un total de 1.500 mg de extracto de schisandra; tres veces al día de un total de 6.000 mg de ácido ascórbico; dos veces al día de un total de 300 mg de L-glutatión; tres veces al día de un total de 750 mg de extracto de cardo lechoso; dos veces al día de un total de 300 mg de ácido lipoico y una vez al día de un total de 800 UI de D-alfa-tocoferol. Durante las diez primeras semanas del estudio, a los sujetos se les proporcionó también una inyección intravenosa (iv) dos veces a la semana de cuatro composiciones parenterales diferentes, ninguna de las cuales contenía silimarina. Después de 10 semanas, un 12,0% de los sujetos y después de 20 semanas un 24,0% de los sujetos mostraron una reducción de 1 registro de carga viral.

No hay indicios en el documento US2005/0123628 de que la silimarina, y menos aún la silibinina, pueda ser responsable de esta reducción comparativamente ligera de la carga viral.

S.J. Polyak *et al.* comparan *in vitro* un extracto de silimarina estandarizado (MK-001) con preparaciones comerciales de silimarina. Ambas preparaciones se dice que muestran una actividad antiviral en los modelos basados en cultivos celulares usados, aunque los efectos de las preparaciones comerciales no fueron tan potentes como MK-001. El MK-001 inhibe la expresión del factor alfa de necrosis tumoral en células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas con anti-CD3 y transcripción dependiente de factor kappa B nuclear en células Huh7 de hepatoma humano. Además, la dosis de MK-001 inhibe de forma dependiente la infección de células Huh7 y Huh7.5.1 mediante el virus JFH-1. El MK-001 muestra efectos frente a la infección de HCV de células aisladas y, cuando se combina con interferón-α, inhibió la replicación de HCV más que el interferón-a solo. Para comparar la acción anti-HCV de MK-001 con preparaciones comerciales de silimarina, se ensayaron también Ultrathistle® (Natural Wellness, Montgomery, NY) y Silybinin® (Indena SpA, Milán). Sin embargo, el MK-001 se dice que provoca una acción viral más potente que Ultrathistle® y Silybinin®. Los autores concluyen a partir de estos ensayos *in vitro* que, en lo que se refiere a la actividad anti-HCV, el extracto de silimarina estandarizado MK-001 es superior a dos productos comerciales. S.J. Polyak nada dice sobre la administración parenteral de silibinina purificada, ni menos sobre el tratamiento de personas no sensibles. Además, los descubrimientos de Polyak *et al.* en desacuerdo con estudios clínicos que encontraron ausencia de efecto de silimarina sobre HCV en pacientes con hepatitis C crónica (MD Tanamly *et al.*, Dig Liver Dis. 2004, 36, 752-9; E Gabbay *et al.*, World J Gastroenterol. 2007, 13, 5317-23).

Berkson (MEDLINE, 1999) describe una propuesta antioxidante triple conservadora para el tratamiento de la hepatitis C.

El documento WO 00/32177 describe el uso de compuestos 17-cetoesteroides, así como los derivados, metabolitos y precursores de estos compuestos y sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de estos compuestos en el tratamiento o la prevención del virus tipo hepatitis C y/o virus tipo hepatitis G en pacientes que necesitan este tratamiento.

El documento WO 02/067853 describe la combinación de un inhibidor de COX-2 selectivo y cistina en primer lugar, para el tratamiento de enfermedades antivirales, que incluyen VIH, individuos inmunodeprimidos, SIDA y hepatitis C.

Ciriaci *et al.* (Gastroenterology, vol. 112, 1997, A1246) describe un ensayo aleatorio referente a interferón alfa frente a silibinina más interferón en hepatitis C crónica previamente resiste a interferón.

Se ha encontrado ahora sorprendentemente que la administración, particularmente la administración parenteral, de un componente de silibinina Preferiblemente pura reduce la carga viral en pacientes de hepatitis viral *in vivo*. Por tanto, el componente de silibinina es capaz de reducir la carga viral. Este descubrimiento permitir optimizar la dosis de silibinina en ausencia de otros constituyentes de silimarina que pueden provocar efectos secundarios no deseados.

La reducción de la carga viral mediante la administración parenteral de un componente de silibinina es particularmente sorprendente, ya que los estudios clínicos encontraron una ausencia de efecto de la silimarina sobre el HCV en pacientes con hepatitis C crónica (M Torres *et al.*, P R Health Sci J 2004, 23(2), 69-74; MD

Tanamly *et al.*, Dig Liver Dis., 2004, 36:752-9; A Gordon *at al.*, J Gastroenterol Hepatol. 2006, 21, 275-80; E Gabbay *et al.*, World J Gastroenterol. 2007, 13, 5317-23; and LB Seeff *et al.*, Hepatology, 2008, 80(11), 1900-6).

M Torres *et al.* informan sobre un ensayo clínico en el que se pidió la participación de pacientes de 21-65 años de edad con diagnóstico de hepatitis C crónica, que no estaban usando una terapia antiviral. Se sometieron al azar 34 pacientes a un tratamiento con *S. marianum*, 160 mg por vía oral, tres veces a la semana durante cuatro semanas o a ningún tratamiento (testigo). El ensayo puso de manifiesto que el *S. marianum* no tiene función alguna como agente antiviral.

MD Tanamly *et al.* informan sobre un ensayo clínico en el que 177 pacientes con el virus de la hepatitis C crónicos fueron asignados aleatoriamente para recibir silimarina o complementos multivitamínicos. El ensayo puso de manifiesto que la dosis recomendada de silimarina no tenía efecto sobre la viremia del virus de la hepatitis C.

A Gordon *et al.* informan sobre un ensayo clínico en el que 24 sujetos con hepatitis C crónica fueron reclutados para un estudio cruzado, controlado con placebo, doblemente ciego y aleatorio. Los sujetos recibieron 12 semanas de *S. marianum* (600 mg o bien 1.200 mg/día) y placebo. Se realizaron ensayos bioquímicos de referencia, virológicos, psicológicos y de calidad de vida. Diecisiete pacientes completaron el ensayo. El ensayo puso de manifiesto que los cambios medios en los títulos de ARN de HCV no eran significativamente diferentes de los sujetos sobre *S. marianum* en comparación con los del placebo.

E. Gabbay *et al.* informan sobre un ensayo clínico en el que 100 pacientes con infección de HCV crónica que habían fracasado en el tratamiento con interferón fueron reclutados y asignados aleatoriamente para recibir siete antioxidantes diferentes, entre ellos cápsulas de silimarina, 250 mg, tid. Los puntos extremos primarios fueron enzimas hepáticas, niveles de HCV-ARN e histología. El ensayo puso de manifiesto que la terapia con antioxidantes no tuvo efecto de tratamiento sobre la carga viral.

LB Seeff *et al.* informan sobre el ensayo del tratamiento a largo plazo antiviral de hepatitis C contra cirrosis (HALT-C), que implicó personas con hepatitis C crónica avanzada, no sensibles a una terapia antiviral anterior pero que estaban todavía deseosos de participar en un tratamiento con interferón pegilado alargo plazo. No se encontró un efecto beneficioso de la silimarina sobre los niveles de ARN del virus de la hepatis C (HCV). En conclusión, los usuarios de silimarina tenían niveles de HCV similares a los no usuarios.

Además, se ha encontrado sorprendentemente que la administración, particularmente la administración parenteral de un componente de silibinina apoya el tratamiento convencional mediante peginterferon/ribavirina. Se encontró que el componente de silibinina (re)activa la susceptibilidad de los pacientes a un tratamiento convencional mediante peginterferon/ribavirina y/o aumenta el efecto antiviral de un tratamiento convencional mediante peginterferon/ribavirina.

Breve descripción de las figuras:

Fig. 1: Ejemplo 1, estudio 1: Parámetros de tensión oxidativa durante y después de una infusión de 10 mg/kg de componente de silibinina durante 4 horas. (Ensayo de d-ROMs = compuestos derivados metabolitos de oxígeno reactivo, ensayo BAP = potencial antioxidante biológico).

Fig. 2: Ejemplo 1, estudio 1: HCV-ARN (registro de UI/ml; media ± SD) antes (día 1) y después de 7 días de 10 mg/kg iv de componente de silibinina/día.

Fig. 3: Ejemplo 1, estudio 1: Cambios en HCV-ARN después de la administración iv de 10 mg/kg/día de componente de silibinina durante 7 días, seguido de terapia de combinación con peginterferon alfa 2a/ribavirina y 140 mg de silimarina TID.

Fig. 4: Ejemplo 1, estudio 2: Cambios en HCV-ARN durante la administración iv de componente de silibinina a diversas dosis durante 14 días, seguido de terapia de combinación con peginterferon alfa 2a/ribavirina que se comenzó el día 8.

Fig. 5: Ejemplo 1, estudio 2: Disminución media (±SD) de HCV-ARN durante 7 días de administración iv de monoterapia de componente de silibinina y 7 días de componente de silibinina iv en combinación con peginterferon alfa 2a/ribavirina a diversas dosis.

Fig. 6: Ejemplo 1, estudio 2: Cambios en HCV-ARN después de la finalización de silibinina iv (semana 2) en los 14 pacientes que recibieron 15 o 20 mg/kg/silibinina/d. La terapia de combinación con peginterferon alfa 2a/ribavirina se comenzó en el día 8 y 280 mg de silimarina TID en el día 15.

Fig. 7: Ejemplo 2, paciente individual, cambios en HCV-ARN después de la administración iv de 20 mg/kg/día de componente de silibinina durante dos intervalos de administración que comprendían 14 días consecutivos, comenzando el primer intervalo de administración iv en la semana 24 y comenzando el segundo intervalo de

administración en la semana 35, durante una terapia de combinación continua con 180 µg de peginterferon alfa 2a/ribavirina durante 60 semanas.

Fig. 8: Ejemplo 2, paciente individual, cambios en HCV-ARN después de una administración iv de 20 mg/kg/día de componente de silibinina durante un intervalo de administración que comprendía 14 días consecutivos y que comenzaba en la semana 32 durante una terapia de combinación continua con 180 µg de peginterferon alfa 2a/ribavirina durante 60 semanas.

Fig. 9: Ejemplo 2, paciente individual, cambios en HCV-ARN después de una administración iv de 20 mg/kg/día de componente de silibinina durante un intervalo de administración que comprendía 14 días consecutivos y que comenzaba en la semana 72 durante una terapia de combinación continua con 180 µg de peginterferon alfa 2A/ribavirina durante 80 semanas.

La fig. 10 muestra esquemáticamente diversos modos de coadministración de ribavirina y/o interferón alfa pegilado y el medicamento que contenía el componente de silibinina.

La fig. 11 muestra datos generados a partir de un estudio de inhibición de NS5B *in vitro* para seis constituyentes purificados de silimarina.

La fig. 12 muestra datos generados a partir de un estudio de inhibición de NS5B *in vitro* para bis(hidrogenosuccinato) de silibinina.

La invención se refiere al uso de un componente de silibinina para la producción de un medicamento, Preferiblemente virustático o antiviral, más Preferiblemente reductor de la carga viral, para el tratamiento de hepatitis viral, en particular de hepatitis C, Preferiblemente de infecciones de virus de hepatitis C crónicas o agudas, Preferiblemente mediante administración parenteral.

Para los fines de la memoria descriptiva, el término “medicamento” es Preferiblemente sinónimo del término “medicación”.

La invención se refiere al uso de un componente de silibinina para la producción de un medicamento que esencialmente no contiene silidianina y/o no contiene silicristina y/o no contiene isosilibinina, para el tratamiento de la hepatitis C.

En una realización preferida, según la invención, el tratamiento de la hepatitis viral, en particular hepatitis C, se lleva a cabo disminuyendo la carga del virus (carga viral). Se ha encontrado que los componentes de silibinina son capaces de reducir la carga viral de pacientes de hepatitis B o C. Esto es particularmente sorprendente, ya que en la técnica anterior no hay evidencia de que la silimarina, que es una mezcla que contiene una cierta cantidad de silibinina, afecte a la carga viral o mejore la histología hepática en la hepatitis B o C (véase la publicación de K.E. Mayer *et al.*, Journal of Viral Hepatitis, 2005, 12, 559-67).

En otra realización preferida según la invención, el tratamiento de la hepatitis viral, en particular hepatitis C, se lleva a cabo en pacientes que experimentarán o han experimentado un trasplante de hígado. Los pacientes que han experimentado un trasplante de hígado debido a una hepatitis viral están en riesgo de restablecer la hepatitis viral en el hígado recientemente trasplantado. Habitualmente, el virus es suprimido de forma incompleta del organismo cuando el hígado infectado es extirpado tras la cirugía y el resto de los virus retenidos en el organismo pueden volver a infectar el hígado recientemente trasplantado. En pacientes infectados de hepatitis C crónica la reinfección después de un trasplante de hígado se produce en un 100% de los casos. Como se ha encontrado sorprendentemente que la silibinina es capaz de disminuir la carga del virus, el riesgo de reinfección después de un trasplante de hígado puede ser sustancialmente reducido mediante la administración, Preferiblemente administración parenteral, de un componente de silibinina.

Las formas de hepatitis viral son conocidas por el experto en la técnica.

En la hepatitis viral, en la actualidad se conocen definitivamente al menos seis formas diferentes: hepatitis A, B, C, D, E y G. Los organismos causantes de estas infecciones son virus hepatotrópicos. Pertenecen a familias de virus diferentes en cada caso y tienen un genoma de ADN o ARN. La transmisión tiene lugar a través de la alimentación o mediante el intercambio de fluidos corporales como esperma y sangre. Se han observado también diferencias entre las diferentes formas con respecto al curso de la enfermedad y la gravedad de la enfermedad. Aunque la hepatitis A y E se producen básicamente en forma aguda, la hepatitis B, C y D puede conducir a cursos crónicos, en algunos con complicaciones graves.

Para los fines de la descripción, la expresión “hepatitis viral” comprende Preferiblemente hepatitis B y C.

En una realización preferida, el tratamiento se lleva a cabo reduciendo la carga del virus de uno o más virus seleccionados entre el grupo que consiste, pero sin limitación, en los genotipos HCV1, HCV2, HCV3, HCV4, HCV5 y HCV6, Preferiblemente HCV1.

Si el genotipo implicado es HCV1, son preferidos los subtipos 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h, 1i, 1j, 1k y 1l. Si el genotipo implicado es HCV2, son preferidos los subtipos 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g, 2h, 2i, 2j, 2k, 2l, 2m, 2n, 2o, 2p y 2q. Si el genotipo implicado es HCV3, son preferidos los subtipos 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i, 3j y 3k. Si el genotipo implicado es HCV4, son preferidos los subtipos 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g, 4h, 4i, 4j, 4k, 4l, 4m, 4n, 4o, 4p, 4q, 4r y 4t. Si el genotipo implicado es HCV5, es preferido el subtipo 5a. Si el genotipo implicado es HCV6, son preferidos los subtipos 6a, 6b, 6c, 6d, 6e, 6f, 6g, 6h, 6i, 6j, 6k, 6l, 6m, 6n, 6o, 6p y 6q. Con respecto a la nomenclatura de los geno- y sub-tipos del virus de la hepatitis C se puede hacer referencia, por ejemplo a la publicación de P. Simmonds *et al.*, Hepatology, 42, 2005, 962-73.

La invención se refiere al uso de un componente de silibinina para la producción de un medicamento, que está adaptado Preferiblemente para una administración parenteral, para el tratamiento de hepatitis C en pacientes que no responden a una terapia de combinación convencional inmunomoduladora/ antiviral como una terapia de ribavirina/interferón ("no sensibles") y/o pacientes que responden parcialmente a una terapia de combinación convencional inmunomoduladora/ antiviral como una terapia de ribavirina/interferón ("parcialmente sensibles") y/o pacientes que muestran una respuesta inicial considerable seguida de recaídas de los títulos virales durante la terapia o posteriormente ("con recaída").

La invención se refiere también al tratamiento de la hepatitis C viral por medio de un componente de silibinina, tratamiento que es posterior a una terapia de combinación convencional por medio de ribavirina/ interferón. Preferiblemente, la terapia mediante administración de un componente de silibinina comienza después de que haya fracasado la terapia de ribavirina/ interferón (ya sea inicialmente o después de un cierto periodo de tratamiento).

En relación con la terapia convencional de hepatitis C mediante la administración de ribavirina/ interferón, las expresiones "no sensibles", "parcialmente sensibles" y "con recaída" son conocidas por el experto en la técnica. En la actualidad, la terapia de interferón pegilado más ribavirina para el virus de la hepatitis C falla en aproximadamente la mitad de pacientes de genotipo 1. El fallo del tratamiento se produce mediante ausencia de respuesta (disminución mínima del título viral) o recaída (respuestas iniciales considerables seguidas de recaídas de los títulos virales durante la terapia o con posterioridad).

Para los fines de la memoria descriptiva, un paciente no sensible es considerado Preferiblemente como un paciente que no muestra una disminución de la carga viral en <2 $\log_{10}$ UI/ml (es decir factor 100) cuando se administra ribavirina/ interferón (habitualmente peg-interferón α), Preferiblemente durante 12 semanas. En una realización preferida, los pacientes no sensibles tienen disminuciones de los títulos virales de $\leq 2{,}1$ $\log_{10}$ UI/ml y títulos absolutos $\geq 4{,}62$ $\log_{10}$ UI/ml en el punto más bajo.

Para los fines de la memoria descriptiva, un paciente parcialmente sensible se considera Preferiblemente como un paciente que no muestra una disminución de la carga viral ≤ 2 $\log_{10}$ UI/ml en la semana 12 con HCV ARN detectable en la semana 24.

Para los fines de la memoria descriptiva, un paciente con recaída es considerado Preferiblemente como un paciente que tiene una disminución de los títulos virales de $\geq 2{,}8$ $\log_{10}$ y su título absoluto cae transitoriamente por debajo del límite de detección ($2{,}78$ $\log_{10}$ UI/ml).

Para los fines de la descripción, el término "medicamento" es sinónimo Preferiblemente de "forma de administración" o de "unidad de dosis". Por ejemplo, un medicamento para una administración oral está relacionado, por ejemplo, en la forma de un comprimido, y este comprimido es Preferiblemente la unidad de dosis que va a ser administrada, que contiene la dosis de componente de silibinina destinada para el tiempo de administración respectivo en un esquema de tratamiento. Si la unidad de dosis comprende un único comprimido, la unidad de dosis corresponde a la forma de administración. Sin embargo, es también posible que la unidad de dosis esté dividida en un cierto número de formas de administración, por ejemplo, un cierto número de comprimidos, en cuyo caso cada uno contiene solo una dosis parcial, pero en la totalidad la dosis total del componente de silibinina, que está destinada durante el tiempo respectivo de administración en un esquema de tratamiento (estos comprimidos de la unidad de dosis están destinados entonces para una administración esencialmente simultánea).

Para los fines de la descripción, la expresión "componente de silibinina" se refiere Preferiblemente a silibinina, incluidos todos sus estereoisómeros, por ejemplo, silibinina A y silibinina B, sus sales y/o derivados farmacéuticamente tolerables, en particular los ésteres. Los ésteres preferidos son derivados de ácidos inorgánicos como ácido fosfórico o ácido sulfúrico; o de ácidos orgánicos como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido mandélico y similares.

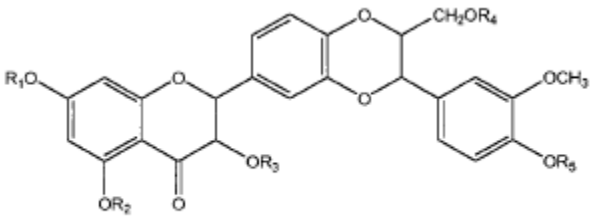
Son particularmente preferidos hemiésteres de ácidos dicarboxílicos, por ejemplo ácido malónico, ácido glutárico, ácido succínico, ácido adípico, ácido subérico, ácido azelaico, ácido sebácico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido itacónico, ácido ftálico, ácido tereftálico, ácido isoftálico, etc. Los hemiésteres preferidos son los dihemisuccinatos, que pueden estar presentes como ácidos libres o como sales, por ejemplo, como las sales de sodio, potasio o amonio. Uno o más de los grupos hidroxilo de la silibinina puede estar esterificado. Preferiblemente, están esterificados 1, 2, 3, 4 o la totalidad de los grupos hidroxilo de la silibinina.

En una realización preferida, el componente el componente de silibinina es C-2',3-bis(hidrogenosuccinato) de

silibinina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como las sales de sodio, sales de potasio, sales de amonio y similares, así como sus mezclas. Es particularmente preferida la sal disodio.

Los ésteres adecuados son también ésteres de ácido glucónico.

Preferiblemente, el componente de silibinina es un compuesto de fórmula general (I)



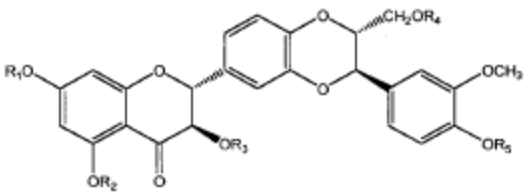
(I)

en la cual

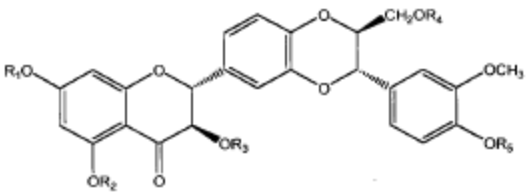
R_1, R_2, R_3, R_4 y R_5 se seleccionan independientemente unos de otros entre el grupo que consiste en -H, -SO_3H, -PO_3H_2, -CO-alquileno C_1-C_8-alquileno-OH, -CO-alquileno-C_1C_8-CO_2H, -CO-alquileno C_1-C_8-SO_3H, -CO-alquileno C_1-C_8-OPO_3H_2, -CO-alquileno C_1-C_8-PO_3H_2, -(alquileno C_2-C_3-O)$_n$-H en que n = 1 a 20, -CO-alquileno C_1-C_8-N(alquil C_1-C_3)$_3$ $^+X^-$, en que X^- es un anión farmacéuticamente tolerable,

o sus sales farmacéuticamente tolerables. Preferiblemente, R_1, R_2 y R_5 son -H.

Más Preferiblemente, el componente de silibinina de fórmula general (I) tiene la estereoquímica de la fórmula general (I-A) o (I-B):



(I-A)



(I-B)

En una realización preferida, el compuesto de fórmula general (I-A) es mezclado con el compuesto de fórmula general (I-B) en cualquier relación en peso relativa, por ejemplo, 50 ±5:50 ±5. Sin embargo, en una realización preferida, el exceso diastereómero del compuesto de fórmula general (I-A) es de al menos 50%de, más Preferiblemente, al menos 75%de, todavía más Preferiblemente al menos 90%de, incluso más Preferiblemente al menos 95%de, lo más Preferiblemente al menos 98%de y en particular al menos 99%de. En otra realización preferida, el exceso diastereómero del compuesto de fórmula general (I-B) es de al menos 50%de, más Preferiblemente, al menos 75%de, todavía más Preferiblemente al menos 90%de, incluso más Preferiblemente al menos 95%de, lo más Preferiblemente al menos 98%de y, en particular, al menos 99%de.

Otros componentes de silibinina preferidos se describen en el documento WO 03/090741, al que se hace referencia en su totalidad.

Preferiblemente, el componente de silibinina en agua pura a temperatura ambiente tiene una solubilidad mejor que la silibinina como tal.

En una realización preferida, la invención se refiere al uso de un éster de silibinina para la producción de un medicamento, que es formulado Preferiblemente para una administración parenteral u oral, para el tratamiento de hepatitis viral, en particular hepatitis C. El medicamento esencialmente no contiene silidianina y/o no contiene silicristina y/o no contiene isosilibinina.

En una realización preferida, el medicamento es formulado para una administración parenteral. La administración parenteral se puede llevar a cabo, por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, intracutánea, intraarticular, intratecal, intracardial, intravitreal, retrobulbar, intrapulmonar e intraósea.

De forma particularmente preferida, el medicamento es formulado para una inyección o infusión, en particular

para una administración intravenosa o intraarterial.

Los medicamentos adecuados que son apropiados para una inyección o infusión son conocidos por el experto en la técnica. A este respecto, por ejemplo, se puede hacer referencia en su totalidad a la publicación de K. H. Bauer *et al.,* Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie [Textbook of Pharmaceutical Technology], WVG Stuttgart 1999.

Los medicamentos que son adecuados para una inyección son habitualmente soluciones, emulsiones o suspensiones esterilizadas, que se preparan disolviendo, emulsionando o poniendo en suspensión la sustancia activa y, opcionalmente, excipientes adicionales en agua, en un líquido no acuoso adecuado que no tiene que estar esterilizado si está justificado, o una mezcla de estos vehículos.

Los medicamentos que son adecuados para una infusión son habitualmente soluciones o emulsiones acuosas esterilizadas con agua como fase continua.

Los medicamentos para una inyección o infusión pueden contener opcionalmente excipientes adicionales. Los excipientes de tipo son Preferiblemente solubilizadores como, por ejemplo, lecitina y poloxámero 188, sustancias para isotonicidad como, por ejemplo, cloruro de sodio, glucosa y manitol, tampones como, por ejemplo, tampones de acetato, fosfato y citratato, antioxidantes como, por ejemplo, ácido ascórbico, metahidrogenosulfito de sodio, sulfito de sodio e hidrogenosulfito de sodio, agentes quelantes como, por ejemplo, edetato de disodio, conservantes como, por ejemplo, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, alcohol bencílico y clorocresol y emulsionantes como, por ejemplo, lecitina, ácidos grasos, esterdes, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno-sorbitán, glicéridos de ácidos grasos de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno, éteres de alcoholes grasos de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de glicerol y poloxámeros.

Un medicamento particularmente preferido es un polvo para la preparación de una solución para infusión que comprende C-2',3-bis(hidrogenosuccinato) de silibinina, Preferiblemente como la sal de disodio y opcionalmente inulina como excipiente. Los recipientes que contienen 598,5 mg de polvo de sal de disodio de C-2',3-bis(hidrogenosuccinato) de silibinina e inulina están adaptados para la preparación de una solución para infusión y se comercializan en Alemania bajo la marca registrada Legalon® SIL. En una realización preferida, el medicamento según la invención es bioequivalente para esta formulación.

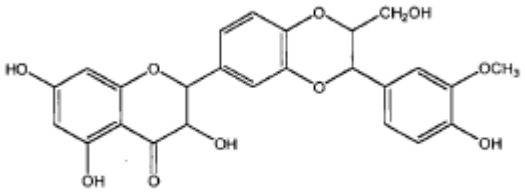
En otra realización preferida, el medicamento es formulado para una administración oral. Preferiblemente, el medicamento es una forma de administración oral seleccionada entre el grupo que consiste en comprimidos, cápsulas, comprimidos revestidos con azúcares, granulados y bolsitas.

Cuando se administra un componente de silibinina a través de la vía oral, se debe asegurar que la biodisponibilidad del componente de silibinina a partir de la forma de dosificación oral sea suficientemente elevada. A este respecto, el factor limitante es lipofilicidad considerable de la silibinina.

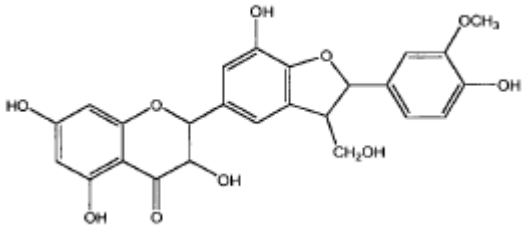
En una realización particularmente preferida, la invención se refiere al uso de un componente de silibinina para la producción de un medicamento que es formulado para una administración oral y esencialmente no contiene silidianina y/o no contienen silicristina y/o no contiene isosilibinina, para el tratamiento dela hepatitis C.

Parece que estos constituyentes adicionales de la silimarina tienen también efecto fisiológico (por ejemplo, pueden provocar efectos secundarios), pero que con respecto al tratamiento de la hepatitis viral, la silibinina (o sus análogos) es la más eficaz, particularmente para reducir la carga viral. Por tanto, cuando se administra silimarina, es decir, una mezcla de silibinina, silidianina, silicristina, isosilibinina y otros constituyentes, la dosis global de silimarina tiene que ser comparativamente elevada con el fin de proporcionar una cantidad particular de silibinina. Por ejemplo, cuando la silimarina contiene, por ejemplo, 42% p de silibinina, la administración de 125 mg de silimarina solo proporciona aproximadamente 52 mg de silibinina y aproximadamente 73 mg de otros compuestos que tienen también un efecto fisiológico (pero no el efecto deseado). El riesgo de efectos secundarios no deseados aumenta con la dosis de una sustancia fisiológicamente activa. Por lo tanto, en lo que se refiere al perfil de los efectos secundarios no deseados, la administración de 52 mg de silibinina sustancialmente pura es superior respecto a la administración de 125 mg de silimarina que tiene un contenido de silibinina de 42% p (véase la publicación de T. Ding *et al.*, "Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS", J. Pharm. Biomed. Anal. 2001, 26(1), 155-161).

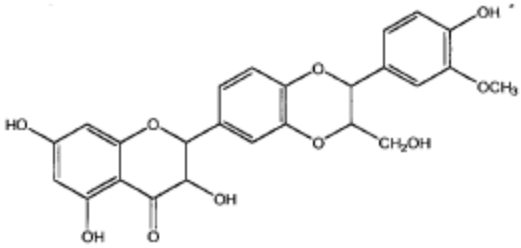
Las estructuras de la silibinina (silybin), silidianina (silydianin), silicristina (silychristin) e isosilibinina (isosilybin) se exponen a continuación, véanse las publicaciones de D.Y.-W. Lee *et al.*, J. Nat. Prod. 2003, 66, 1171-4; N.-C. Kim *et al.*, Org. Biomol. Chem., 2003, 1, 1684-9):



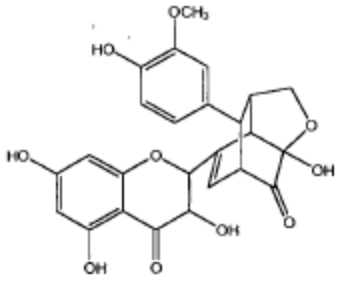
silibinina



silicristina



isosilibinina



silidianina

Las formas de administración adecuadas que son apropiadas para una administración oral (medicamentos orales) son conocidas por el experto en la técnica. A este respecto, se puede hacer referencia en su totalidad, por ejemplo, a la publicación de K. H. Bauer *et al.*, Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie [Textbook of Pharmaceutical Technology], WVG Stuttgart 1999.

La forma de administración oral se selecciona Preferiblemente entre el grupo que consiste en comprimidos, polvos, granulados, gránulos, comprimidos revestidos con azúcares, jarabes, jugos, soluciones, polvos efervescentes, gránulos efervescentes, comprimidos efervescentes, liofilizados y cápsulas. De forma particularmente preferida, la forma de administración oral es un comprimido, un comprimido revestido con azúcares, gránulos, granulado o polvo, de forma particularmente preferida un comprimido.

Los excipientes adecuados para la formulación de formas de administración oral son conocidos por el experto en la técnica. A este respecto se puede hacer referencia, por ejemplo, a la publicación de H. P. Fiedler, Lexikon der Hilfstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete [Encyclopedia of excipients for pharmacy, cosmetics and related areas], Editio Cantor Aulendorf, 2001.

Los comprimidos pueden ser obtenidos, por ejemplo, mezclando el componente de silibinina con excipientes conocidos, por ejemplo, diluyentes inertes como carbonato de calcio, fosfato de calcio o lactosa, disgregantes como almidón o ácido algínico, aglutinantes como almidón o gelatina, lubricantes como estearato de magnesio o talco y/o agentes para conseguir el efecto de depósito como carboximetilcelulosa, acetato-ftalato de celulosa o poli(acetato de vinilo). Los comprimidos pueden consistir también en un cierto número de capas. A parte de los vehículos mencionados, los comprimidos pueden contener también aditivos como, por ejemplo, citrato de sodio, carbonato de calcio y fosfato de dicalcio, junto con diversas sustancias adicionales como almidón, Preferiblemente almidón de patata, gelatina y similares. Adicionalmente, pueden usados adyuvantes de flujo como estearato de magnesio, lauril-sulfato de sodio y talco para la formación de comprimidos.

Los comprimidos revestidos con azúcares pueden ser producidos por ejemplo, revistiendo los núcleos producidos análogamente a los comprimidos con agentes habitualmente usados en revestimientos de comprimidos revestidos con azúcares, por ejemplo, colidona o gama laca, goma arábiga, talco, dióxido de titanio o azúcar. Para evitar un efecto de depósito o para evitar incompatibilidades, el núcleo puede consistir también en un cierto número de capas. La capa de comprimido revestido con azúcar puede consistir también en un cierto número de capas para conseguir el efecto de depósito, siendo posible usar los excipientes anteriormente mencionados en el caso de los comprimidos.

Los jugos, jarabes, emulsiones, suspensiones y soluciones para una administración oral pueden contener adicionalmente un edulcorante como sacarina, ciclamato, glicerol o azúcar y un agente para mejorar el sabor, por ejemplo, sabores como vanillina o extracto de naranja. Además pueden contener componentes auxiliares para la suspensión o espesantes como carboximetilcelulosa de sodio, agentes humectantes, por ejemplo, productos de condensación de ácidos grasos con óxido de etileno o conservantes como ésteres de ácido p-hidroxibenzoico.

Las cápsulas pueden ser producidas, por ejemplo, mezclando el componente de silibinina con vehículos inertes como lactosa o sorbitol y encapsulando en cápsulas de gelatina. Como excipientes se pueden mencionar, por ejemplo, agua, disolventes orgánicos farmacéuticamente aceptables como parafinas (por ejemplo, fracciones del petróleo), aceites de origen vegetal (por ejemplo, aceite de cacahuete o sésamo), alcoholes mono- o polifuncionales (por ejemplo, etanol o glicerol), vehículos como, por ejemplo, minerales naturales triturados (por ejemplo, caolines, arcillas, talco, caliza), minerales sintéticos triturados (por ejemplo, ácido silícico y silicatos altamente dispersos), azúcares (por ejemplo, sacarosa, lactosa y dextrosa), emulsionantes (por ejemplo, lignina, líquidos residuales de sulfitos, metilcelulosa, almidón y polivinilpirrolidona) y adyuvantes de flujo (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, ácido esteárico y lauril-sulfato de sodio).

El medicamento puede liberar el componente de silibinina inmediatamente o en una forma controlada. Si la liberación tiene lugar en una forma controlada, la liberación tiene lugar Preferiblemente en forma retardada. La liberación retardada se entiende según la invención dirigida Preferiblemente a un perfil de liberación en el que el componente de silibinina es liberado durante un periodo de tiempo relativamente prolongado con una velocidad reducida de absorción con el objetivo de una acción terapéutica prolongada. Esto se consigue, en particular, en el caso de una administración oral. La expresión “con liberación al menos parcialmente retardada” según la invención comprende cualquier medicamento que garantice una liberación modificada del componente de silibinina contenido en el mismo. Los medicamentos son formas de administración Preferiblemente revestidas o sin revestir que se producen usando excipientes especiales, según los procedimientos particulares o mediante combinación de ambas posibilidades, con el fin de modificar selectivamente la velocidad de liberación o el sitio de liberación. Con respecto al transcurso del tiempo de liberación, en el caso de los medicamentos según la invención se incluyen los siguientes tipos: liberación retrasada (liberación extendida), liberación de acción repetida, liberación prolongada y liberación sostenida. Con respecto a otros detalles se puede hacer referencia, por ejemplo, a la publicación de to K. H. Bauer et al., Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie [Textbook of Pharmaceutical Technology], 6th edition, WVG Stuttgart, 1999.

Las mediciones adecuadas para la liberación controlada de compuesto activo son conocidas por el experto en la técnica. Si el medicamento es una forma de administración oral, por ejemplo, un comprimido, se puede conseguir una liberación retrasada, por ejemplo, incorporando el componente de silibinina en una matriz polímera y/o revistiendo con una película la forma de administración oral por medio de una membrana.

Según la invención, se pueden emplear medicamentos sólidos, semisólidos o líquidos con un comportamiento de liberación controlada. Son preferidos los medicamentos sólidos como, por ejemplo, sistemas osmóticos orales (OROS), comprimidos revestidos, comprimidos de matriz, comprimidos multicapas, comprimidos encamisados, comprimidos revestidos con azúcares encamisados, granulados de difusión, adsorbatos y cápsulas de gelatina blandas de depósito.

El medicamento oral con liberación controlada de compuesto activo es de forma particularmente preferida un comprimido revestido, comprimido encamisado o comprimido de matriz, de forma particularmente preferida un comprimido de matriz.

Los medicamentos con liberación controlada de compuesto activo pueden contener el componente de silibinina en forma disuelta, en suspensión y/o sólida, amorfa o cristalina.

Para la producción de los medicamentos según la invención con liberación controlada de compuesto activo, el componente de silibinina puede ser empleado en diversos tamaños de partículas, por ejemplo, sin triturar, triturado o en forma micronizada.

En los medicamentos con liberación controlada de compuesto activo, el componente de silibinina está presente Preferiblemente en la forma de partículas que contienen sustancia activa como, por ejemplo, granulados, gránulos, microcápsulas, comprimidos, materiales extruidos o cristales, que están revestidos con una membrana de difusión controlada.

Los medicamentos de difusión controlada son Preferiblemente multipartículas, es decir, consisten Preferiblemente en una multiplicidad de núcleos revestidos como, por ejemplo, de granulados neutros, a los que se aplica una mezcla del componente de silibinina con un aglutinante y espesante habitual, opcionalmente junto con excipientes y vehículos habituales y son secuencialmente revestidos con una laca de difusión, el plastificante y otros excipientes. Los medicamentos de difusión controlada según la invención pueden consistir además en núcleos homogéneos que comprenden el componente de silibinina, que son producidos, por ejemplo, mediante granulación, granulación con rotor, aglomeración con lecho fluidizado, formación de comprimidos, extrusión en húmedo o extrusión en estado fundido opcionalmente con esferonización y son revestidos con una laca de difusión que puede contener plastificantes y otros excipientes.

Las partículas que contienen el componente de silibinina pueden contener excipientes como, por ejemplo, ácidos o sustancias tamponantes, que modifican el pH y contribuyen así a reducir la dependencia de la liberación del componente de silibinina del pH del medio de liberación.

La membrana de difusión controlada puede contener además otros excipientes que debido a su solubilidad dependiente del pH ejercen una influencia sobre la permeabilidad de la membrana a diversos valores del pH y contribuyen así a minimizar la dependencia del pH de la liberación del componente de silibinina.

Los aglutinantes y expesantes usados en la producción de granulados neutros revestidos son Preferiblemente hidroxipropilmetilcelulosas (HPMC) y polivinilpirrolidona (PVP). Análogamente, se pueden emplear otros polímeros naturales, sintéticos o parcialmente sintéticos como, por ejemplo, metilcelulosa (MC), hidroxipropilcelulosa (HPC), otras hidroxialquilcelulosas e hidroxialquilmetilcelulosas, carboximetilcelulosas y sus sales, poli(ácidos acrílicos), polimetacrilatos, gelatina, almidón o derivados de almidón.

Para la producción de granulados, las partículas y (mini)comprimidos que contienen el componente de silibinina, celulosa, celulosa microcristalina, derivados de celulosa como, por ejemplo, HMPC, HPC e hidroxipropilcelulosa poco sustituida (L-HPC), fosfato de dicalcio, lactosa, PVP y sacarosa se emplean Preferiblemente como aglutinantes y materiales de carga por medio de granulación, aglomeración en lecho fluidizado, extrusión en húmedo y formación de comprimidos.

Los granulados por extrusión en estado fundido se producen incorporando el componente de silibinina en excipientes termoplásticos. Los excipientes termoplásticos adecuados son preferente HPC, HPMC, etilcelulosa, acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS), PVP, copolímero de vinilpirrolidona/ acetato de vinilo, polietilenglicol, poli(óxido de etileno), polimetacrilatos, poli(alcoholes vinílicos) (PVA), poli(acetato de vinilo) (PVA) parcialmente hidrolizado, polisacáridos, por ejemplo, ácido algínico, alginatos, galactomananos, ceras, grasas y derivados de ácidos grasos.

En las partículas que contienen el componente de silibinina, es posible además incorporar sustancias modificadoras del pH como, por ejemplo, ácidos, bases y sustancias tamponantes. Mediante la adición de estas sustancias, es posible reducir considerablemente la dependencia del pH de la liberación del componente de silibinina y sus sales, hidratos y sorbatos.

Los excipientes empleados que modifican el pH en los núcleos que contienen el componente de silibinina son, por ejemplo, ácido adípico, ácido málico, L-arginina, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutámico, hidrogenotartrato de potasio, ácido maleico, ácido malónico, ácido metanosulfónico, ácido toluenosulfónico, trometamol o ácido tartárico. Preferiblemente se usan ácido cítrico, ácido succínico, ácido tartárico e hidrogenotartrato de potasio.

Para la producción de la laca de difusión, son Preferiblemente adecuados etil-celulosas (por ejemplo, Aquacoat® o Surelease®) y polimetacrilatos (por ejemplo Eudragit® NE, Eudragit® RS y RL). Sin embargo, pueden ser empleados también otros materiales como, por ejemplo, acetato de celulosa y acetato-butirato de celulosa como polímeros controladores de la difusión formadores de película.

Además del polímero controlador de la difusión, la laca de difusión puede contener también otros excipientes con solubilidad dependiente del pH como, por ejemplo, polímeros entéricos como ftalato de celulosa, en particular acetato-ftalato de celulosa y ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinatos de celulosa, en particular acetato-succinato de celulosa y acetato-succinato de hidroxi-propilmetilcelulosa o polimetacrilatos (por ejemplo, Eudragit® L). Mediante la adición de estas sustancias, es posible reducir la dependencia del pH de la liberación del componente de silibinina.

Los plastificantes usados son, por ejemplo, derivados de ácido cítrico, derivados de ácido ftálico, ácido benzoico y ésteres de ácido benzoico, otros ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos, ésteres de ácidos dicarboxílicos, alifáticos, mono-, di- o triacetato glicerol, polioles, ácidos grasos y sus derivados, glicéridos de ácidos grasos acetilados, aceite de ricino y otros aceites vírgenes, miglyol y alcoholes de ácidos grasos.

Con el fin de evitar la adherencia de las partículas revestidas durante la producción y en el producto acabado, se pueden añadir a la laca antiadherentes como, por ejemplo, talco, estearato de magnesio, monoestearato de glicerol y Aerosil.

La velocidad de liberación es controlada mediante la composición de la laca y el grosor de la capa de laca. Se pueden añadir a la laca aditivos que aumenten la permeabilidad de la película que son agentes formadores de poros o a las partículas que van a ser revestidas que contienen el componente de silibinina. Los agentes formadores de poros empleados son polímeros solubles como, por ejemplo, polietilenglicoles, PVP, PVA, HPMC, HPC, hidroxietilcelulosas (HEC), MC, carboximetilcelulosas o sus sales, dextrinas, maltodextrinas, ciclodextrinas, dextranos u otras sustancias solubles como, por ejemplo, urea, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de amonio, sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, maltosa, manitol, sorbitol, xilitol y lactitol.

Los excipientes con solubilidad dependiente del pH que pueden ser constituyentes de la película de difusión son, por ejemplo, polímeros entéricos como ftalatos de celulosa, en particular acetato-ftalato de celulosa y ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinatos de celulosa, en particular acetato-succinato de celulosa y acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa y polimetacrilatos (por ejemplo, Eudragit® L).

Además, el medicamento con liberación controlada del componente de silibinina puede ser una forma de administración revestida que contiene uno o más excipientes hinchables que se hinchan fuertemente por la penetración de líquido a través de la membrana y provocan que el revestimiento se abra por desgarramiento como consecuencia del hinchamiento y la expansión de volumen. Como consecuencia de la abertura por desgarramiento del revestimiento, se hace posible la liberación de producto farmacéutico desde el medicamento (liberación por impulsos). Como excipientes hinchables, estos medicamentos contienen Preferiblemente polivinilpirrolidonas, crospovidonas, carboximetilcelulosa de sodio reticulada, carboximetil-almidón de sodio reticulado, poli(óxidos de etileno), polimetacrilatos, hidroxipropilmetilcelulosa con baja sustitución (L-HPC). Los materiales de revestimiento adecuados son Preferiblemente acetato de celulosa, etilcelulosa y polimetacrilatos.

Los medicamentos revestidos, controlados por difusión o por impulsos descritos pueden ser empleados directamente e inalterados en una forma farmacéutica. Sin embargo, pueden ser adicionalmente tratados, opcionalmente mediante la adición de excipientes, para proporcionar la forma de administración final (por ejemplo, cápsula, comprimido, bolsita). Con el fin de conseguir un perfil de liberación deseado, varias partículas revestidas se pueden combinar también unas con otras en una forma farmacéutica y puede tener lugar una administración de una dosis inicial, por ejemplo, mediante la combinación de partículas de liberación rápida, por ejemplo, granulados, gránulos o polvos no revestidos.

Los medicamentos con liberación controlada que pueden ser usados son también formulaciones que comprenden el componente de silibinina en una matriz. Estas formulaciones de matriz liberan el componente de silibinina mediante difusión y/o erosión. Preferiblemente, estos medicamentos están presentes en la forma de un comprimido o en la forma de un cierto número de comprimidos que pueden estar, por ejemplo, encapsulados. Los comprimidos pueden estar revestidos o lacados. Estos medicamentos se producen, por ejemplo, mezclando los constituyentes y produciendo directamente comprimidos o mediante granulación en seco o en húmedo con posterior formación de comprimidos.

Los agentes formadores de matriz empleados pueden ser sustancias solubles en agua, hinchables en agua o insolubles en agua. Preferiblemente, los medicamentos contienen uno o más polímeros hinchables en agua.

Los polímeros formadores de matriz solubles en agua o hinchables en agua empleados son Preferiblemente hidroxipropilmetilcelulosas (HPMC), hidroxietilmetilcelulosas, hidroxipropilcelulosas (HPC), hidroxietilcelulosas, metilcelulosas (MC), etilcelulosas, otras alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas e hidroxialquilmetilcelulosas, carboximetilcelulosas de sodio (NaCMC), alginatos, galactomananos como, por ejemplo, goma guar y harina de algarrobo, xantanos, poli(óxidos de etileno), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), derivados de poli(ácido metacrílico), poli(alcoholes vinílicos) (PVA), poli(acetato de vinilo) parcialmente hidrolizado (PVAc), polivinilpirrolidona (PVP), agar, pectina, goma arábiga, tragacanto, gelatina, almidón o derivados de almidón y mezclas de esta sustancia. Es particularmente preferido el uso de HPMC. Además, las sustancias insolubles en agua se pueden emplear como agentes formadores de estructuras, por ejemplo, ácidos grasos insaturados o saturados (hidrogenados) y sus sales, ésteres o amidas, mono-, di- o triglicéridos de ácidos grasos, ceras, ceramidas, derivados de colesterol y mezclas de estas sustancias.

Los medicamentos pueden contener además excipientes habituales formadores de comprimidos, Preferiblemente sílice altamente dispersa (Aerosil®), estearato de magnesio, talco, PVP, lactosa o celulosa microcristalina.

Además, las sustancias pueden ser incorporadas en la matriz que controla el pH en la matriz. Mediante la adición de estos excipientes modificadores del pH y/o mediante la adición de sustancias que se disuelven con un pH creciente o que disuelven la matriz y aumentan así la porosidad o permeabilidad de la matriz y/o favorecen la erosión de la matriz, el posible que estas realizaciones preferidas de la presente invención consigan una liberación casi independiente del pH.

La matriz que contiene el componente de silibinina puede estar presente también en formas geométricas especiales en las que la liberación está influenciada por la geometría especial y la superficie de la matriz. La superficie de la matriz y la superficie de liberación pueden ser controladas, por ejemplo, mediante compresión para proporcionar formatos especiales (por ejemplo, comprimidos anulares) y/o mediante revestimiento de subáreas o aplicación de capas de barrera por medio de una prensa multicapas.

Las formulaciones con diferentes perfiles de liberación se pueden combinar Preferiblemente para proporcionar una forma farmacéutica en comprimidos multicapas o de encamisado-núcleo. Por ejemplo, por medio de comprimidos multicapas que comprenden una capa de liberación rápida, o comprimidos de encamisado-núcleo que tienen un encamisado de liberación rápida, se consiguen las liberaciones controladas según la invención con una liberación inicial elevada del componente de silibinina, mientras que por medio de comprimidos de encamisado-núcleo con un núcleo de liberación rápida se puede conseguir una liberación final acelerada.

Un medicamento adicional con liberación controlada del componente de silibinina es aquel en el que el componente de silibinina es incorporado en una matriz que consiste en uno o más excipientes fisiológicamente

aceptables por medio de un procedimiento en estado fundido. La liberación del componente de silibinina a partir de estas “materias extruidas en estado fundido” tiene lugar mediante difusión y/o erosión. Preferiblemente, estas formulaciones con liberación controlada del componente de silibinina están presentes en la forma de gránulos, granulados o comprimidos. Las formas obtenidas mediante extrusión en estado fundido, en particular los granulados y gránulos, pueden ser tratadas para proporcionar otras formas farmacéuticas como, por ejemplo, mediante encapsulación o formación de comprimidos, opcionalmente con la adición de excipientes farmacéuticamente habituales. Además, las materias extruidas en estado fundido según la invención pueden ser trituradas y posteriormente empleadas en esta forma fracturadas para la producción de otros medicamentos como, por ejemplo, comprimidos de matriz. El tratamiento adicional comprende también la combinación de formulaciones que tienen una liberación farmacéutica diferente como, por ejemplo, partículas de liberación retardada y rápida, para proporcionar un medicamento.

Las materias extruidas en estado fundido y/o las formas farmacéuticas que se producen a partir de las materias extruidas en estado fundido pueden ser revestidas o lacadas. Las materias extruidas en estado fundido se producen Preferiblemente mezclando el componente de silibinina con al menos un excipiente (vehículo) fusible farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otras sustancias farmacéuticas adicionales habituales, que funden a una temperatura en el intervalo de 50 a 250ºC, Preferiblemente de 60 a 200ºC, moldeo por inyección o extrusión y conformación. En el transcurso de esto, la mezcla de los componentes puede tener lugar antes de la fusión o durante la fusión, o algunos de los componentes son fundidos y los demás constituyentes son añadidos a esta materia fundida. La mezcla del vehículo, el componente de silibinina y las sustancias adicionales opcionalmente presentes son termoplásticamente deformables y, por lo tanto, pueden ser extruidas. Numerosos métodos sugieren por sí mismos la conformación de la mezcla, por ejemplo, granulación en caliente, granulación en frío, calandrado, extrusión y deformación del hilo todavía plástico o redondeo.

Los vehículos termoplásticos usados que son Preferiblemente hinchables o solubles en medios fisiológicos son Preferiblemente: polivinilpirrolidona (PVP), copolímeros de N-vinilpirrolidona (NVP) y ésteres vinílicos, en particular acetato de vinilo, copolímeros de acetato de vinilo y ácido crotónico, poli(acetato de vinilo) parcialmente hidrolizado, poli(alcohol vinílica), ésteres de celulosa, éteres de celulosa, en particular metilcelulosa y etilcelulosa, hidroxialquilcelulosas, en particular hidroxipropilcelulosa, hidroxialquilmetilcelulosas, en particular hidroxipropilmetilcelulosa e hidroxietilmetilcelulosa, carboximetilcelulosas, ftalatos de celulosa, en particular acetato-ftalato de celulosa y ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinato de celulosa, en particular acetato-succinato de celulosa y acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, poli(acrilatos de hidroxialquilo), poli(metacrilatos de hidroxialquilo), poliacrilatos y polimetacrilatos (tipos Eudragit®), copolímeros de metacrilato de metilo y ácido acrílico, poliláctidos, polietilenglicoles, poli(óxidos de etileno) y polisacáridos como galactomananos y ácido algínico y sus sales de metales alcalinos y amonio.

Los excipientes termoplásticos preferidos para la producción de los medicamentos con liberación controlada del componente de silibinina son HPC, PVP, copolímeros de vinilpirrolidona/ acetato de vinilo, polimetacrilatos, en particular Eudragit® L, HPMCAS, polietilenglicoles, poli(óxidos de etileno) y sus mezclas. Los excipientes plastificantes que pueden ser empleados para la reducción de la temperatura de transición vítrea de la mezcla son, por ejemplo, propilenglicol, glicerol, trietilenglicol, butanodioles, pentanoles como pentaeritritol, hexanoles, alcoholes de cadena larga, polietilenglicoles, polipropilenglicoles, polietileno/polipropilenglicoles, siliconas, derivados de ácido ftálico (por ejemplo, ftalato de dimetilo, ftalato de dietilo o ftalato de dibutilo), ácido benzoico y ésteres de ácido benzoico, otros ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos (por ejemplo, ésteres de ácido trimelítico), derivados de ácido cítrico (por ejemplo, citrato de trietilo, citrato de tributilo, citrato de acetiltrietilo), ésteres de ácidos dicarboxílicos (por ejemplo, adipatos dedialquilo, ésteres de ácido sebácico, en particular sebacato de dietilo, ésteres de ácido tartárico), mono-, di- o triacetato de glicerol, ácidos grasos y derivados (por ejemplo, monoestearatos de glicerol, glicéridos de ácidos grasos acetilados, aceite de ricino y otros aceites vírgenes, miglyol), alcoholes de ácidos grasos (por ejemplo, alcohol cetílico o alcohol cetilestearílico), azúcares, alcoholes de azúcares y derivados de azúcares (por ejemplo, eritritol, isomaltitol, lactitol, manitol, maltitol, maltodextrina o xilitol).

Además del componente de silibinina, el(los) vehículo(s) y opcionalmente plastificante(s), la mezcla extruible puede contener todavía otras sustancias adicionales farmacéuticamente habituales, por ejemplo, lubricantes y agentes desprendedores del molde, adyuvantes de flujo y agentes de flujo, materiales de carga y adsorbentes, estabilizadores, atrapadores de radicales libres, agentes complejantes, antioxidantes, fotoestabilizadores, propelentes, tensioactivos, conservantes, colorantes, edulcorantes y sabores.

Los lubricantes y agentes desprendedores del molde pueden contener, por ejemplo, ácido esteárico y estearatos, en particular estearatos de aluminio, calcio y magnesio, behenato de calcio, estearilfumarato de sodio, talco, siliconas, ceras, y mono-, di- y triglicéridos como, por ejemplo, monostearato de glicerol, distearato de glicerol, dibehenato de glicerol, monooleato de glicerol, palmitoestearato de glicerol.

Los agentes de flujo son Preferiblemente grasas animales y vegetales, Preferiblemente en forma hidrogenada y con un punto de fusión de al menos 50ºC, ceras (por ejemplo, cera de carnauba), mono-, di- y triglicéridos (por ejemplo, monostearato de glicerol, diestearatos de glicerol, di-behenato de glicerol, monooleato de glicerol,

palmito-estearato de glicerilo), fosfátidos, en particular lecitina.

Los materiales de carga usados son Preferiblemente sustancias como dióxido de titanio, óxido de aluminio, óxido de magnesio, ácido silícico y silicatos, ácido esteárico y estearatos, derivados de celulosa (por ejemplo, metilcelulosa), almidón y derivados de almidón, azúcares, alcoholes de azúcares y derivados de azúcares.

Los medicamentos con liberación controlada del componente de silibinina pueden ser también materias extruidas en estado fundido que contienen excipientes con propiedades modificadoras del pH y/o una solubilidad dependiente del pH. Por medio de estos excipientes (por ejemplo, los ácidos, bases, sustancias tamponantes y polímeros entéricos ya descritos con anterioridad), es posible minimizar la dependencia del pH de la liberación del componente de silibinina.

En la producción de las materias extruidas en estado fundido, se puede producir la formación de “soluciones sólidas”, en las que el componente de silibinina está presente en la matriz en una forma molecularmente dispersa.

Los medicamentos con liberación controlada del componente de silibinina pueden ser también sistemas de liberación farmacéutica osmóticos. En principio, los sistemas osmóticos de este tipo son conocidos en la técnica anterior. En este caso, la liberación farmacéutica a partir de la forma farmacéutica está basada en general en una presión osmótica en forma de una fuerza impulsora

El sistema osmótico consiste Preferiblemente en un núcleo que contiene el componente de silibinina, opcionalmente un agente de hinchamiento hidrófilo y opcionalmente una sustancia soluble en agua para inducir la ósmosis y opcionalmente otros excipientes farmacéuticamente aceptables y una capa que consiste en un material permeable al agua que es impermeable para los componentes del núcleo y tiene al menos una abertura, a través de la cual pueden ser liberados los constituyentes presentes en el núcleo.

El material a partir del cual se forman estos medicamentos según la invención con una liberación controlada de componente de silibinina es semimpermeable, es decir, permeable para el agua, medios acuosos y fluidos biológicos y nada o muy restringidamente permeable para los componentes del núcleo, y adecuado para la formación de película. El material de envoltura selectivamente semiimpermeable es insoluble en fluidos corporales, no se erosiona, no se degrada en el tracto gastrointestinal y es excretado de forma inalterada o muestra una bioerosión solo al final del periodo de liberación.

Los materiales típicos para la producción de las capas del sistema osmótico son Preferiblemente derivados de celulosa acilados (ésteres de celulosa), que están mono- a trisustituidos con grupos acetilo o mono- a disustituidos con grupos acetilo y un radical acilo adicional distinto de acetilo, por ejemplo, acetato de celulosa, triacetato de celulosa, acetato de celulosa/carbamato de etilo, acetato-ftalato de celulosa, acetato-metilcarbamato de celulosa, acetato-succinato de celulosa, acetato-dimetilaminoacetato de celulosa, acetato-dietilaminoacetato de celulosa, acetato-etilcarbonato de celulosa, acetato-cloroacetato de celulosa, acetato-etoxilato de celulosa, acetato-metilsulfonato de celulosa, acetato-butilsulfonato de celulosa, acetato-propionato de celulosa, acetato-octoato de celulosa, acetato-laurato de celulosa, acetato-p-toluenosulfonato de celulosa, acetato-butirato de celulosa y otros derivados de acetatos de celulosa y también acetato de agar y acetato de amilosa.

Un material de membrana semiimpermeable adecuado del sistema osmótico es adicionalmente etilcelulosa, copolímeros de óxido de alquileno y alquil-gliceril-éter, epóxidos polímeros, poliglicoles y derivados de poli(ácido láctico). Además, se pueden emplear mezclar de acrilatos solubles en agua por sí mismos, por ejemplo, un copolímero de acrilato de etilo y metacrilato de metilo.

Si es necesario, la capa del sistema osmótico puede contener también plastificantes como, por ejemplo, las sustancias plastificantes ya mencionadas con anterioridad y otras sustancias adicionales como, por ejemplo, agentes formadores de poros. Si es necesario, se puede aplicar una laca fotoprotectora a la capa semiimpermeable que puede consistir, por ejemplo, en HPMC O HPC y un plastificante adecuado (por ejemplo, polietilenglicol) y pigmentos (por ejemplo, dióxido de titanio u óxidos de hierro).

Con el fin de hacer posible la administración de una dosis inicial del componente de silibinina, el sistema osmótico puede estar provisto también con una capa que contenga el componente de silibinina, a partir de la cual el componente de silibinina es Preferiblemente liberado de forma rápida por contacto con el medio de liberación antes de que comience la liberación osmóticamente controlada del componente de silibinina desde el núcleo.

Los polímeros hinchables en agua adecuados que pueden estar presentes en el núcleo del sistema osmótico son Preferiblemente poli(óxidos de etileno) (por ejemplo, Polyox®), goma de xantano, copolímeros de vinilpirrolidona y acetato de vinilo, polivinilpirrolidonas, crospovidonas, carboximetilcelulosa de sodio reticulada, carboximetil-almidón de sodio reticulado, hidroxipropilmetilcelulosa con baja sustitución (L-HPC), poli(metacrilato de hidroxialquilo), alginatos y galactomananos y también agentes de hinchamiento polímeros hidrófilos adiciones y sus mezclas.

Las sustancias osmóticamente activas adecuadas que pueden ser añadidas al núcleo para la inducción de la ósmosis sales solubles en agua de ácidos inorgánicos u orgánicos o sustancias orgánicas no iónicas con un elevado grado de solubilidad en agua como, por ejemplo, hidratos de carbono, en particular azúcares o aminoácidos, a modo de ejemplo, se pueden mencionar unas pocas sustancias que pueden ser incorporadas en el núcleo del sistema osmótico individualmente o como una mezcla para la inducción de la ósmosis: sales inorgánicas como cloruros, sulfatos, sulfitos, carbonatos, bicarbonatos, fosfatos, hidrogenofosfatos y dihidrogenofosfatos de los metales alcalinos y metales alcalinotérreos como, por ejemplo, sodio, litio, potasio, calcio o magnesio, ácidos orgánicos como ácido adípico, ácido ascórbico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido benzoico y otras sales de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, acetatos, pentosas como, por ejemplo, arabinosa, ribosa o xilosa, hexosas como, por ejemplo, glucosa, fructosa, galactosa o manosa, disacáridos como, por ejemplo, sacarosa, maltosa o lactosa, trisacáridos como, por ejemplo, rafinosa, alcoholes de azúcares como, por ejemplo, manitol, sorbitol, maltitol, xilitol o inositol, y urea. El cloruro de sodio y el carbonato de sodio son usados de forma particularmente preferida.

Además, el sistema osmótico puede contener otras sustancias adicionales farmacéuticamente habituales como, por ejemplo, lubricantes y agentes de desprendimiento del molde, adyuvantes de flujo, aglutinantes, pigmentos coloreados, espesantes, coloides protectores, estabilizadores y tensioactivos.

La producción del sistema de liberación osmótica se lleva a cabo Preferiblemente por medio de técnicas estándar como, por ejemplo, granulación en húmedo o compactación en seco, formación de comprimidos y posterior revestimiento orgánico.

La capa del sistema osmótico tiene al menos una abertura de salida, a través de la cual es liberado el componente de silibinina, opcionalmente junto con otros constituyentes del núcleo. La abertura puede ser introducida en las capas de diversas formas, por ejemplo, mediante punción, perforación mecánica o por medio de un taladro láser. El término “abertura” comprende también materiales bioerosionables que disuelven la capa tras la administración de este medicamento según la invención y, por tanto, conduce a la formación de aberturas de salida *in situ*.

En una realización adicional para la liberación controlada del componente de silibinina, el componente de silibinina puede estar presente también en forma de un complejo de intercambio iónico (adsorbato).

Preferiblemente, el medicamento es formulado para una administración una vez al día (c.d.), dos veces al día (b.i.d.), tres veces al día (t.i.d.) o cuatro veces al día.

En una realización preferida, se han liberado de 0,5 a 75% en peso del componente de silibinina originalmente contenido desde el medicamento después de 1 h bajo condiciones *in vitro*. Las condiciones adecuadas para la determinación de la liberación *in vitro* de sustancia activa son conocidas por el experto en la técnica. A este respecto se puede hacer referencia, por ejemplo a la Farmacopea Europea. Preferiblemente, la determinación de la liberación se lleva a cabo por medio de un aparato agitador de paletas en jugo gástrico artificial (tampón pH 1,2) o jugo intestinal artificial (tampón 7,6). La cantidad de componente de silibinina liberada puede ser analizada, por ejemplo, por medio de HPLC y detección UV.

Los perfiles de liberación preferidos A_1 a A_8 se resumen en la siguiente tabla:

después [h]	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7	A_8
	% en p.	% en p.	% en p.	% en p.	% en p.	% en p.	% en p.	% en p.
0,5	5,0-34	6,0-33	7,0-32	9,0-31	11-30	13-30	15-29	17-28
1	12-53	15-52	18-50	20-48	22-46	24-44	27-42	30-40
2	25-74	27-71	29-68	31-65	33-62	36-60	39-58	42-56
3	33-85	36-82	39-79	42-76	45-73	48-71	50-69	52-67
4	41-92	44-89	47-86	50-83	53-81	55-79	58-77	60-75
6	52-98	55-97	58-96	60-94	63-92	66-90	69-88	72-86
8	>62	>65	>68	71-99	74-98	76-98	78-97	80-97
12	>70	>73	>76	>79	>82	>84	>86	>88

En una realización preferida, el medicamento contiene una ciclodextrina y/o un fosfolípido.

Las formulaciones farmacéuticas que contienen silibinina y ciclodextrina son conocidas en la técnica anterior (véase, por ejemplo, el documento EP 422 497). Preferiblemente, la silibinina forma un complejo de inclusión con la ciclodextrina. Las ciclodextrinas preferidas son α-, β- y γ-ciclodextrinas o sus derivados de O-alquilo C_1-C_4 e hidroxialquilo C_1-C_4.

Las formulaciones farmacéuticas que contienen silibinina y fosfolípidos son análogamente conocidas en la técnica anterior (véase el documento US 4 764 508). Preferiblemente, la silibinina forma un complejo con el fosfolípido. Los fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. Los complejos de fosfolípidos de silibinina preferidos son complejos terciarios que contienen adicionalmente vitamina E (α-tocoferol). Los complejos de este tipo son conocidos en la técnica anterior como “complejos SPV” (A Federico, Gut. 2006, 55(6), 901-2).

Además del componente de silibinina, el medicamento puede contener uno o más terpenos. Mediante la acción del terpeno, se pueden mejorar globalmente tanto los requisitos de absorción como los procedimientos de absorción y, por tanto, la absorción. Los terpenos pueden ser aceites etéreos, naturales o sintéticos y/o sus constituyentes terpenoides en la forma de sustancias puras o de mezclas de derivados de estas sustancias puras. Entre los aceites etéreos se puede hacer mención en particular al aceite de tomillo, aceite de eucalipto, aceite de pinocha, aceite de árbol de té, aceite de cajeput, aceite de cardamomo, aceite de menta, aceite de salvia y aceite de romero, Preferiblemente aceite de tomillo. Para los terpenos como sustancias que está previsto también que incluyan sustancias terpenoides, se puede hacer mención, en particular, a los hemiterpenos como, por ejemplo, isopreno, ácido tíglico, ácido angélico, ácido isovalérico; los monoterpenos, que incluyen los monoterpenos acíclicos como, por ejemplo, 2,6-dimetiloctano, α-mirceno, (E)-p-ocimeno, perileno, linalool, geranial, (S)-(+)citronelal y monoterpenos monocíclicos como, por ejemplo, ciclopropano-monoterpenos y ciclobutano-monoterpenos como ácido crisantémico o junionona, ciclopentano-monoterpenos como, por ejemplo, iridoides o nepetalactonas o (-)-secologanina y (-)-oleuropeina, ciclohexano-monoterpenos como o-mentano, cis- o trans-p-mentano, (R)-(+)-limoneno, terpinoles, (-)-mentol, (+)-perilaldehido, (-)-mentona o (+)-carvona, monoterpenos bicíclicos como los terpenos con puentes de oxígeno 1,4-cineol, 1,8-cineol, o ascaridol; los biciclos de ciclopropano carano y tujano, los biciclos de ciclobutano pinano y los bicicloheptanos canfano y fenchano; los sesqui-terpenos como famesano, bisabolano, germacrano, elemano y humulano. Los terpenos particularmente preferidos son timol, mentol, cineol, borneol, carvona, limoneno y pineno, de forma habitualmente preferida timol.

El medicamento contiene un componente de silibinina. La silibinina es un constituyente de la silimarina. Preferiblemente, además de la silibinina o los componentes de silibinina, el medicamento no contiene otros constituyentes de silimarina. Si el componente de silibinina es silibinina como tal, el medicamento no contiene Preferiblemente otros constituyentes de silibinina. Si el componente de silibinina no es silibinina como tal, por ejemplo, un éster de silibinina, el medicamento Preferiblemente no contiene constituyentes de silimarina en absoluto, es decir, tampoco silibinina.

Una o más de las sustancias seleccionadas entre el grupo que consiste en isosilibinina, silidianina, silicristina, taxifolina, isosilicristina, silimonina, silandrina, silihermina y neosilihermina no están contenidos en el medicamento, es decir, el medicamento está esencialmente exento de al menos una de las sustancias anteriormente mencionadas. A este repecto, “esencialmente exento” significa que el contenido residual de la sustancia referida es de menos de 2,0% en peso, más Preferiblemente menos de 1,0% en peso, incluso más Preferiblemente menos de 0,5% en peso, lo más Preferiblemente menos de 0,1% en peso y, en particular, menos de 0,05% en peso, basado en el peso total del medicamento. Los métodos analíticos para la determinación del contenido residual de estas sustancias son conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, HPLC.

Se ha encontrado que los constituyentes individuales de silimarina difieren en sus propiedades químicas y físicas y contribuyen a la actividad farmacológica de la silimarina hasta un alcance muy diferente, de forma que es ventajoso administrar silibinina o sus derivados y/o sales como el único constituyente de silimarina, es decir, de forma única. Parece que de esta forma se puede mejorar tanto la eficacia como el cumplimiento del paciente.

Además, se ha encontrado sorprendentemente que la tolerancia a los diversos constituyentes de silimarina difiere de uno a otro y que la silibinina es más tolerable, particularmente menos tóxica, que la silimarina (es decir, la mezcla que contiene otros compuestos aparte de silibinina).

En una realización preferida, la invención se refiere al uso de un componente de silibinina para la producción de un medicamento que se formula Preferiblemente para una administración parenteral u oral y, aparte de componente de silibinina, no contiene otros constituyentes de silimarina, para el tratamiento de hepatitis viral, en particular de hepatitis C.

Los medicamentos particularmente preferidos que están adaptados para la administración oral del componente de silibinina se describen con posterioridad. Todas estas formas de dosificación oral tienen en común que contienen Preferiblemente el componente de silibinina en forma sustancialmente pura, es decir, Preferiblemente en ausencia de otros constituyentes de silimarina, particularmente en ausencia de isosilibinina y/o silicristina y/o silidianina.

Preferiblemente, las formas de dosificación oral son formas de dosificación de liberación inmediata, es decir, el

componente de silibinina es liberado rápidamente a partir de las mismas, conduciendo así a una aparición rápida del fármaco en el tracto gastrointestinal. En una realización preferida, 30 minutos de la administración de la forma de dosificación oral, al menos un 75% p, más Preferiblemente al menos un 80% p, todavía más Preferiblemente al menos un 85% p, lo más Preferiblemente al menos un 90% p y, en particular, al menos un 95% p del componente de silibinina originalmente contenido ha sido liberado a partir de la dosificación oral.

En una realización preferida, el medicamento es proporcionado en forma de una solución sólida, la solución sólida se realiza Preferiblemente incorporando el componente de silibinina en forma dispersa molecular en una matriz polímera altamente soluble, Preferiblemente amorfa, que tiene un área superficial específica grande. El componente de silibinina debe estar presente en forma dispersa molecular, es decir, en ninguna forma microcristalina o fina. Se puede haber conseguido ya un estado amorfo altamente soluble utilizando disolventes polímeros sólidos altamente solubles cuando se extrae silibinina o el componente de silibinina a partir del extracto de silimarina. Esta formulación técnica del fármaco aumenta la solubilidad del componente de silibinina y su velocidad de disolución.

Un ejemplo de esta solución sólida comprende el componente de silibinina, un polímero adecuado (por ejemplo, polivinilpirrolidona (PVP), o un copolímero de polivinilpirrolidona, como Kollidon® 25) y, opcionalmente, una dextrina (por ejemplo, maltodextrina). La formulación puede contener otros excipientes como aerosil y/o talkum.

Se muestran en la tabla siguiente realizaciones preferidas B_1 a B_6 de la solución sólida:

% p	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	B_6
Componente de silibinina	1,0-50	2,5-20	8,0±5,0	8,0±4,0	8,0±3,0	8,0±2,0
PVP	1,0-97	10-80	64±15	64±12	64±10	64±7,0
Dextrina	1,0-70	5,0-50	22,8±20	22,8±15	22,8±10	22,8±7,0
aerosil	0-10	0-7,5	4,0±3,0	4,0±2,5	4,0±2,0	4,0±1,5
talco	0-5,0	0-2,5	1,2±1,0	1,2±0,7	1,2±0,5	1,2±0,3

La formulación puede ser proporcionada, por ejemplo, en una cápsula de gelatina dura.

En otra realización preferida, el medicamento es proporcionado en forma de una microemulsión autoemulsionante. Pueden ser usados como portadores sistemas lípidos autoemulsionantes y pueden conducir a una biodisponibilidad elevada del fármaco contenido en los mismos. El sistema lípido es de naturaleza coloidal y esto permite la resorción de micropartículas, especialmente de tamaño coloidal, también a través del sistema linfático en el tracto gastrointestinal. Normalmente, el fármaco disuelto está saturado pero no se produce la recristalización. Tras una administración oral de fármacos lipófilos, por ejemplo, del componente de silibinina, la microemulsión sirve principalmente como un vehículo optimizado que aumenta la velocidad de disolución del fármaco disuelto o altamente dispersado en el lugar de absorción. Dicho de otro modo, el sistema lípido actúa como un mejorador de la absorción.

Un ejemplo de este sistema lípido comprende el componente de silibinina, un primer emulsionante adecuado (por ejemplo, lauroil-macrogolglicérido, como Gelucire® 44/14) y, opcionalmente, un segundo emulsionante adecuado (por ejemplo, caprilocapril-macrogolglicérido, como Labrasol®). La formulación puede contener otros excipientes, como polisorbato.

Se muestra en la tabla siguiente realizaciones preferidas C_1 a C_6 de la solución sólida:

% p	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6
Componente de silibinina	0,1-50	0,5-20	4,0±3,5	4,0±3,0	4,0±2,5	4,0±2,0
Primer emulsionante	1,0-99	5-97	54±15	54±12	54±10	54±7,0
Segundo emulsionante	0-70	0-70	41±20	41±15	41±10	41±7,0
Polisorbato	0-10	0-7,5	1,5±1,0	1,5±0,7	1,5±0,5	1,5±0,3

La formulación, que puede ser sólida o, Preferiblemente, semilíquida, puede ser proporcionada, por ejemplo, en una cápsula de gelatina dura o como una cápsula de gelatina blanda.

En todavía otra realización preferida, el medicamento es proporcionado en forma de una formulación

nanotecnológica. El tamaño de partículas de las nanopartículas está Preferiblemente por debajo de 1 µm. Las nanopartículas son capaces de traspasar membranas biológicas de estructuras celulares. El componente de silibinina es Preferiblemente adsorbido a la superficie de dichas nanopartículas. Las nanopartículas se seleccionan Preferiblemente entre el grupo que consiste en nanopartículas inorgánicas y nanopartículas orgánicas.

Las nanopartículas inorgánicas comprenden silicatos cristalinos, por ejemplo, de origen mineral o silicatos artificiales como metalosilicatos, por ejemplo, alumosilicatos (por ejemplo, zeolitas). Estas nanopartículas inorgánicas están químicamente modificadas Preferiblemente de forma que porten cargas electrostáticas. Los silicatos son triturados de forma ultrafina hasta nanopartículas y el componente de silibinina se une (es adsorbido) a la superficie microporosa de las nanopartículas.

Las nanopartículas orgánicas incluyen agrupaciones o aglomerados de proteínas pequeñas u oligopéptidos o de lípidos. Un portador proteico es, por ejemplo, protamina.

Los métodos para la preparación de nanopartículas son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar nanopartículas coloidales como portadores para una liberación oral de fármacos mediante pulverización del fármaco, es decir, el componente de silibinina, junto con materiales portadores adecuados bajo presión, por ejemplo, a 60 ºC, a través de inyectores que están equipados con filtros perforados (matrices) en forma de torres fuertemente enfriadas. El enfriamiento espontáneo forma una fase amorfa que consiste en nanopartículas.

Dichas nanopartículas lípidas, por ejemplo, pueden ser preparadas mediante esta homogeneización a presión elevada y posterior enfriamiento por pulverización. Preferiblemente el fármaco, es decir, el componente de silibinina, es empleado en forma de una solución en un disolvente adecuado o en forma de submicropartículas. El componente de silibinina puede ser pulverizado y presurizado-homogeneizado, respectivamente, en mezcla con un vehículo lípido y un tensioactivo, por ejemplo, a 60ºC. Después de la adición opcional de materiales de carga finos como una fase externa, así como de adyuvantes de flujo y otros tensioactivos, la formulación así obtenida puede ser introducida en cápsulas de gelatina dura.

Un ejemplo de estas nanopartículas lípidas sólidas comprende un núcleo del componente de silibinina, un primer emulsionante adecuado (por ejemplo, estearoil-macrogolglicérido, como Gelucire® 50/13) y, opcionalmente, un tensioactivo no iónico macromolecular adecuado (por ejemplo, un poloxámero). La formulación contiene además Preferiblemente una fase externa (revestimiento) que comprende un primer tensioactivo (por ejemplo, Tween 20), aerosil y un segundo tensioactivo (por ejemplo, palmitoestearato de glicerilo, como Percirol®).

En la tabla siguiente se muestran realizaciones preferidas D_1 a D_6 de la solución sólida:

% p	D_1	D_2	D_3	D_4	D_5	D_6
Componente de silibinina	0,1-30	0,5-20	4,5±3,0	4,5±2,5	4,5±2,0	4,5±1,5
Primer emulsionante	10-99	20-95	75±20	75±15	75±10	75±7,5
Tensioactivo no iónico macromolecular	0-50	0-40	15±10	15±7,5	15±5	15±2,5
Primer tensioactivo	0-10	0,1-7,5	1,5±0,7	1,5±0,5	1,5±0,3	1,5±0,2
aerosil	0-10	0,1-7,5	3,0±2,0	3,0±1,5	3,0±1,0	3,0±0,7
Segundo tensioactivo	0-10	0,1-7,5	1,5±0,7	1,5±0,5	1,5±0,3	1,5±0,2

Las nanopartículas cargadas consiguen una aparición sustancialmente más rápida del fármaco.

El medicamento contiene el componente de silibinina Preferiblemente en una dosis de al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 20 mg, al menos 25 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg, al menos 100 mg, al menos 125 mg, al menos 150 mg, al menos 175 mg o al menos 200 mg; más Preferiblemente al menos 225 mg, al menos 250 mg, al menos 275 mg, al menos 300 mg, al menos 325 mg, al menos 350 mg, al menos 375 mg o al menos 400 mg; incluso más Preferiblemente al menos 425 mg, al menos 450 mg, al menos 475 mg, al menos 500 mg, al menos 525 mg, al menos 550 mg, al menos 575 mg o al menos 600 mg; lo más Preferiblemente al menos 625 mg, al menos 650 mg, al menos 675 mg, al menos 700 mg, al menos 725 mg, al menos 750 mg, al menos 775 mg o al menos 800 mg; y en particular al menos 825 mg, al menos 850 mg, al menos 875 mg, al menos 900 mg, al menos 925 mg, al menos 950 mg, al menos 975 mg, o al menos 1.000 mg; en cada caso como una dosis equivalente basada en silibinina.

El medicamento contiene el componente de silibinina Preferiblemente en una dosis de al menos 1,0 mg/kg, más Preferiblemente al menos 2,5 mg/kg, incluso más Preferiblemente al menos 5,0 mg/kg, lo más Preferiblemente al menos 7,5 mg/kg y en particular al menos 10 mg/kg, al menos 12,5 mg/kg, al menos 15 mg/kg, al menos

17,5 mg/kg, al menos 20 mg/kg, al menos 22,5 mg/kg, al menos 25 mg/kg, al menos 27,5 mg/kg o al menos 30 mg/kg, basado en el peso corporal del paciente y en cada caso como una dosis equivalente basada en silibinina. Preferiblemente, dicha dosis es una dosis diaria. Por tanto, cuando el medicamento está adaptado, por ejemplo, para una administración dos veces al día, la dosis diaria respectiva se divide en dos partes de la misma cantidad. Análogamente, cuando el medicamento está adaptado, por ejemplo, para una administración tres veces al día, la dosis diaria respectiva se divide en tres partes de la misma cantidad.

En una realización preferida, la dosis diaria de componente de silibinina es de al menos 5, másPreferiblemente al menos 10, todavía más Preferiblemente al menos 15 y lo más Preferiblemente al menos 20 mg por kg de peso corporal, basado en el peso equivalente de silibinina.

En una realización preferida, la dosis diaria del componente de silibinina es de 20 mg por kg de peso corporal, basado en el peso equivalente de silibinina. Por tanto, cuando el medicamento está adaptado para una administración una vez al día, Preferiblemente contiene la cantidad total del componente de silibinina, por ejemplo, 1.400 mg de silibinina para un paciente que tiene un peso corporal de 70 kg. Cuando el medicamento está adaptado para una administración dos veces al día, contiene Preferiblemente la mitad de la cantidad del componente de silibinina, por ejemplo, 700 mg de silibinina para un paciente que tiene un peso corporal de 70 kg. Cuando el medicamento está adaptado para una administración tres veces al día, contiene Preferiblemente un tercio de la cantidad del componente de silibinina, por ejemplo, 467 mg de silibinina para un paciente que tiene un peso corporal de 70 kg. Cuando el medicamento está adaptado para una administración cuatro veces al día, contiene Preferiblemente un cuarto de la cantidad del componente de silibinina, por ejemplo, 350 mg de silibinina para un paciente que tiene un peso corporal de 70 kg.

Cuando el medicamento está adaptado para una administración parenteral, Preferiblemente para infusión, un régimen de tratamiento preferido comprende 4 infusiones iguales que duran 2 horas cada una. Preferiblemente, después de 4 horas la misma infusión se repite de forma que por cada 24 horas se administran en total 4 infusiones. Este régimen puede ser abreviado esquemáticamente como "2-4-2-4-2-4-2-4", en que cada cifra indica un número de horas y las cifras subrayadas indican la duración de una infusión mientras que las cifras no subrayadas indican una fase de demora entre dos intervalos de infusión. Preferiblemente, el régimen de tratamiento es uniforme, es decir, por 24 horas todas las infusiones son igualmente dosificadas durante periodos de tiempo iguales y las fases de demora entre infusiones consecutivas son también iguales.

Siguiendo las indicaciones anteriores, los regímenes de administración parenteral preferidos se resumen en la tabla siguiente:

Una vez al día	0,5-23,5; 1-23; 15-22,5; 2-22; 2,5-21,5; 3-21; 3,5-20,5; 4-20; 6-18; 12-12; 24;
Dos veces al día	0,5-11,5-0,5-11,5; 1-11-1-11; 1,5-10,5-1,5-10,5; 2-10-2-10; 2,5-9,5-2,5-9,5; 3-9-3-9; 3,5-8,5-3,5-8,5, 4-8-4-8; 6-6-6-6; 8-4-8-4;
Tres veces al día	0,5-7,5-0,5-7,5-0,5-7,5; 1-7-1-7-1-7; 1,5-6,5-1,5-6,5-1,5-6,5; 2-6-2-6-2-6; 2,5-5,5-2,5-5,5-2,5-5,5; 3-5-3-5-3-5; 3,5-4,5-3,5-4,5-3,5-4,5; 4-4-4-4-4-4; 6-2-6-2-6-2;
Cuatro veces al día	0,5-5,5-0,5-5,5-0,5-5,5-0,5-5,5; 1-5-1-5-1-5-1-5; 1,5-4,5-1,5-4,5-1,5-4,5-1,5-4,5; 2-4-2-4-2-4-2-4; 2,5-3,5-2,5-3,5-2,5-3,5-2,5-3,5; 3-3-3-3-3-3-3-3; 3,5-2,5-3,5-2,5-3,5-2,5-3,5-2,5; y 4-2-4-2-4-2-4-2.

En una realización preferida, el medicamento está adaptado para una administración una, dos, tres o cuatro veces al día de forma que la dosis diaria global que es administrada cuando se administra el medicamento en el modo prescrito, es de cantidades de al menos 300 mg, al menos 325 mg, al menos 350 mg, al menos 375 mg o al menos 400 mg; más Preferiblemente al menos 425 mg, al menos 450 mg, al menos 475 mg, al menos 500 mg, al menos 525 mg, al menos 550 mg, al menos 575 mg o al menos 600 mg; todavía más Preferiblemente al menos 625 mg, al menos 650 mg, al menos 675 mg, al menos 700 mg, al menos 725 mg, al menos 750 mg, al menos 775 mg o al menos 800 mg; todavía más Preferiblemente al menos 825 mg, al menos 850 mg, al menos 875 mg, al menos 900 mg, al menos 925 mg, al menos 950 mg, al menos 975 mg, o al menos 1.000 mg; lo más Preferiblemente al menos 1.050 mg, al menos 1.100 mg, al menos 1.150 mg, al menos 1.200 mg o al menos 1.250 mg; y en particular al menos 1.300 mg, al menos 1.350 mg, al menos 1.400 mg, al menos 1.450 mg o al menos 1.500 mg; en cada caso como una dosis equivalente basada en silibinina.

Los parámetros farmacinéticos preferidos AUC_{0-t}, $AUC_{t-\infty}$, $AUC_{0-\infty}$ y $AUC_{0-\infty}$ (corr.) (Preferiblemente después de varias infusiones, por ejemplo, después de 11 infusiones; dosis única: 12,5 mg/kg; dosis diaria: 4 infusiones; dosis total: 11 infusiones) y se resumen como las realizaciones E_1 a E_8 en la siguiente tabla:

	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6	E_7	E_8
	mg h/ml	mg h/ml	mg h/ml	mg h/ml	mg h/ml	mg h/ml	mg h/ml	mg h/ml
AUC_{0-t}	333 ± 200	333 ± 150	333 ± 125	3331 100	333 ± 80	333 ± 60	333 ± 40	333 ± 20
$AUC_{t-\infty}$	322 ± 200	322 ± 150	322 ± 125	322 ± 100	322 ± 80	322 ± 60	322 ± 40	322 ± 20
$AUC_{0-\infty}$	655 ± 200	655 ± 150	655 ± 125	655 ± 100	655 ± 80	655 ± 60	655 ± 40	655 ± 20
$AUC_{0-\infty}$ (corr.)	414 ± 200	414 ± 150	414 ± 125	414 ± 100	414 ± 80	414 ± 60	414 ± 40	414 ± 20

En una realización preferida de la invención, el medicamento que contiene el componente de silibinina está adaptado para una terapia adjunta, Preferiblemente para terapias de combinación inmunomoduladora/antiviral como interferón/ ribovarina.

En una realización preferida, además del componente de silibinina, el medicamento contiene un producto farmacéutico adicional que es adecuado Preferiblemente para el tratamiento de enfermedades hepáticas inflamatorias, de forma particularmente preferida de enfermedades hepáticas virales, en particular para el tratamiento de la hepatitis B o C.

Preferiblemente, el producto farmacéutico adicional se selecciona entre el grupo que consiste en agentes terapéuticos hepáticos, lipotrópicos [A05B]; nucleósidos, nucleótidos, inhibidores exclusivos de transcriptasa inversa [J05AB]; interferones [L03AB] y anticuerpos monoclonales para HBV (virus de la hepatitis B). Las referencias indicadas entre corchetes se refieren al índice de ATC, Preferiblemente en la versión alemana de 2007.

De forma particularmente preferida, el producto farmacéutico adicional entre el grupo que consiste en glutamato de arginina, citiolona, epomediol, oxoglurato de ornihina, tidiacicarginina, mioinositol, metionina y N-acetil-metionina, colina, aspartato de ornitina, cianidanol, tiopronina, betaina, cianocobalamina, leucina, laevulosa, aciclovir, idoxuridina, vidarabina, ribavirina, ganciclovir, famciclovir, valaciclovir, cidofovir, penciclovir, valganciclovir, brivudina, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-n1, interferón beta-1a, interferón beta-1b, interferón alfacon-1, peginterferón alfa-2b, peginterferón alfa-2a e interferón gamma 1b.

En una realización preferida, el tratamiento del paciente con el componente de silibinina sirve para el tratamiento de soporte y/o preparación de hepatitis viral, en particular hepatitis B o C, a continuación de este tratamiento con otro producto farmacéutico que se selecciona Preferiblemente entre el grupo que consiste en glutamato de arginina, silimarina, citiolona, epomediol, oxoglurato de ornitina, tidiacicarginina, mioinositol, metionina y N-acetil-metionina, colina, aspartato de ornitina, cianidanol, tiopronina, betaina, cianocobalamina, leucina, laevulosa, aciclovir, idoxuridina, vidarabina, ribavirina, ganciclovir, famciclovir, valaciclovir, cidofovir, penciclovir, valganciclovir, brivudina, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-n1, interferón beta-1a, interferón beta-1b, interferón alfacon-1, peginterferón alfa-2b, peginterferón alfa-2a e interferón gamma 1b.

Por tanto, Preferiblemente a continuación del tratamiento de la hepatitis viral, en particular de hepatitis C con el medicamento que contiene el componente de silibinina, tiene lugar el tratamiento de la hepatitis viral, en particular de hepatitis B o C, con otro medicamento.

En una realización preferida, el medicamento se formula como un constituyente de un tratamiento secuencial, siendo administrado inicialmente el medicamento durante un primer periodo Preferiblemente por vía parenteral y siendo administrado posteriormente otro medicamento durante un segundo periodo. Preferiblemente, el primer periodo comprende al menos 2 días, más Preferiblemente al menos 3 días, incluso más Preferiblemente al menos 4 días, lo más Preferiblemente al menos 5 días y, en particular, al menos 6 días. Preferiblemente, el segundo periodo comprende más días que el primer periodo. Preferiblemente, el segundo periodo comprende al menos 2 días, más Preferiblemente al menos 3 días, incluso más Preferiblemente al menos 4 días, lo más Preferiblemente al menos 5 días y en particular al menos 6 días. En una realización particular, el segundo medicamento contiene una combinación de ribavirina e interferón alfa pegilado y el segundo periodo comprende un tiempo de 24 a 48 horas.

Preferiblemente, el otro medicamento contiene uno o más productos farmacéuticos seleccionados entre el grupo que consiste en glutamato de arginina, silimarina, citiolona, epomediol, oxoglurato de ornitina, tidiacicarginina, mioinositol, metionina y N-acetil-metionina, colina, aspartato de ornitina, cianidanol, tiopronina, betaina, cianocobalamina, leucina, laevulosa, aciclovir, idoxuridina, vidarabina, ribavirina, ganciclovir, famciclovir, valaciclovir, cidofovir, penciclovir, valganciclovir, brivudina, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-n1, interferón beta-1a, interferón beta-1b, interferón alfacon-1, peginterferón alfa-2b, peginterferón alfa-2a, interferón gamma 1b y anticuerpos monoclonales para HBV, de forma particularmente preferida un interferón y/o ribavirina y/o silimarina. Si el otro medicamento contiene un

interferón, este es Preferiblemente interferón alfa pegilado (peginterferón alfa-2a o peginterferón alfa-2b).

En una realización particularmente preferida, el otro medicamento contiene uno o más productos farmacéuticos seleccionados entre el grupo que consiste en isosilibinina, silidianina, silicristina, taxifolina, isosilicristina, silimonina, silandrina, silihermina y neosilihermina, más Preferiblemente solo un producto farmacéutico seleccionado de la lista que antecede. Preferiblemente, el otro medicamento contiene un componente silibinina como se define en relación con el medicamento anteriormente escrito que es administrado durante el primer periodo y está de forma esencialmente preferida exenta de al menos uno, Preferiblemente al menos la totalidad de las sustancias anteriormente mencionadas. A este respecto, “esencialmente exento” significa que el contenido residual de la sustancia implicada es Preferiblemente menos de 2,0% en peso, más Preferiblemente menos de 1,0% en peso, incluso más Preferiblemente menos de 0,5% en peso, lo más Preferiblemente menos de 0,1% en peso y en particular menos de 0,05% en peso, basado en el peso total del medicamento.

El otro medicamento puede ser formulado en principio para una administración parenteral u oral. Según la invención, es formulado Preferiblemente para otra vía de administración que la del medicamento que es administrado durante el primer periodo. De forma particularmente preferida, el otro medicamento es formulado para una administración oral. En una realización particularmente preferida según la invención, el medicamento que es administrado durante el primer periodo está adaptado para una administración parenteral, Preferiblemente intravenosa y el otro medicamento que es administrado durante el segundo periodo que sigue al primer periodo está adaptado para una administración oral.

En una realización preferida, el régimen de tratamiento según la invención comprende dos fases que siguen una a otra de forma consecutiva, a saber, un primer periodo y un segundo periodo. Preferiblemente, durante el primer periodo el medicamento que contiene el componente de silibinina es administrado Preferiblemente por vía parenteral, pero ningún otro medicamento que tenga un efecto hepático es administrado simultáneamente. Durante el segundo periodo, otro medicamento es administrado que contiene Preferiblemente ribavirina y/o interferón alfa pegilado. En otra realización, el medicamento que contiene el componente de silibinina es administrado también durante el segundo periodo, Preferiblemente por vía parenteral. En otra realización preferida, el medicamento que contiene el componente de silibinina no es administrado durante el segundo periodo, es decir, solamente es administrado dicho otro medicamento.

Las realizaciones preferidas F_1 a F_{15} del régimen de tratamiento bifásico se resumen en la tabla siguiente

Nº de días	F_1	F_2	F_3	F_4	F_5	F_6	F_7	F_8	F_9	F_{10}	F_{11}	F_{12}	F_{13}	F_{14}	F_{15}
Primer periodo	≥ 1	≥ 1	≥ 2	≥ 2	≥ 2	≥ 3	≥ 3	≥ 4	≥3	≥ 4	≥ 4	≥ 5	≥ 5	≥ 7	≥ 7
Segundo periodo	≥ 1	≥ 2	≥ 1	≥ 2	≥ 3	≥ 2	≥ 3	≥ 3	≥ 4	≥ 4	≥ 5	≥ 4	≥ 5	≥ 7	≥ 14

En otra realización preferida, el régimen de tratamiento según la invención comprende tres fases que siguen una a otra consecutivamente, a saber, un primer periodo, un segundo periodo y un tercer periodo. Preferiblemente, durante el primer periodo el medicamento que contiene el componente de silibinina es administrado, Preferiblemente por vía parenteral, pero ningún otro medicamento que tenga un efecto hepático es administrado de forma simultánea. Durante el segundo periodo, es administrado otro medicamento que contiene Preferiblemente ribavirina y/o interferón alfa pegilado y el medicamento que contiene el componente de silibinina es administrado también durante el segundo periodo, Preferiblemente por vía parenteral. Preferiblemente, durante el tercer periodo es administrado dicho otro medicamento que contiene Preferiblemente ribivirina y/o interferón alfa pegilado, pero el medicamento que contiene el componente de silibinina no es administrado durante el tercer periodo, es decir, solamente es administrado dicho otro medicamento.

Las realizaciones preferidas G_1 a G_{15} del régimen de tratamiento trifásico se resumen en la tabla siguiente:

Nº de días	G_1	G_2	G_3	G_4	G_5	G_6	G_7	G_8	G_9	G_{10}	G_{11}	G_{12}	G_{13}	G_{14}	G_{15}
Primer periodo	≥ 1	≥ 1	≥ 2	≥ 1	≥ 1	≥ 2	≥ 2	≥ 2	≥ 3	≥ 4	≥ 5	≥ 6	≥ 7	≥ 14	≥ 14
Segundo periodo	≥ 1	≥ 2	≥ 1	≥ 1	≥ 2	≥ 2	≥ 1	≥ 2	≥ 3	≥ 4	≥ 5	≥ 6	≥ 7	≥ 7	≥ 14
Tercer periodo	≥ 1	≥1	≥ 1	≥ 2	≥ 2	≥ 1	≥ 2	≥ 2	≥ 3	≥ 4	≥ 5	≥ 6	≥ 7	≥ 7	≥ 7

Todavía, en otra realización preferida, el régimen de tratamiento según la invención comprende tres fases que

siguen una a otra de forma consecutiva, a saber, un primer periodo, un segundo periodo y un tercer periodo. Preferiblemente, durante el primer periodo es administrado otro medicamento que contiene Preferiblemente ribavirina y/o interferón alfa pegilado y el medicamento que contiene el componente de silibinina no es administrado durante el primer periodo. Durante el segundo periodo, es administrado todavía otro medicamento que contiene Preferiblemente ribavirina y/o interferón alfa pegilado y es administrado también el medicamento que contiene el componente de silibinina (coadministrado) durante el segundo periodo, Preferiblemente por vía parenteral. Preferiblemente, durante el tercer periodo es administrado dicho otro medicamento que contiene Preferiblemente ribivirina y/o interferón alfa pegilado, pero no es administrado durante el tercer periodo el medicamento que contiene el componente de silibinina, es decir, solamente es administrado dicho otro medicamento. Dicho de otro modo, según esta realización preferida, dicho otro medicamento que contiene Preferiblemente ribavirina y/o interferón alfa pegilado es administrado continuamente, o durante un periodo intermedio (= segundo periodo) es coadministrado el medicamento que contiene el componente de silibinina, Preferiblemente por vía parenteral.

Las realizaciones preferidas H_1 a H_{15} del régimen de tratamiento trifásico se resumen en la tabla siguiente:

Nº de días	H_1	H_2	H_3	H_4	H_5	H_6	H_7	H_8	H_9	H_{10}	H_{11}	H_{12}	H_{13}	H_{14}	H_{15}
Primer periodo	≥ 1	≥ 1	≥ 2	≥ 1	≥ 1	≥ 2	≥ 2	≥ 2	≥ 3	≥ 4	≥ 5	≥ 6	≥ 7	≥ 14	≥ 14
Segundo periodo	≥ 1	≥ 2	≥ 1	≥ 1	≥ 2	≥ 2	≥ 1	≥ 2	≥ 3	≥ 4	≥ 5	≥ 6	≥ 7	≥ 7	≥ 14
Tercer periodo	≥ 1	≥ 1	≥ 1	≥ 2	≥ 2	≥ 1	≥ 2	≥ 2	≥ 3	≥ 4	≥ 5	≥ 6	≥ 7	≥ 7	≥ 7

La figura 10 exhibe diversos modos de coadministración de ribavirina y/o interferón alfa pegilado y el medicamento que contiene el componente de silibinina (realizaciones a_1) a m_2)). Cada barra se refiere a un periodo de tiempo de administración. Por ejemplo, según la realización f_1), la administración comienza con ribavirina/peg interferón alfa y continúa. Durante el periodo intermedio, es coadministrado el componente de silibinina.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un medicamento como se describió anteriormente, Preferiblemente adaptado para una administración parenteral, para tratar hepatitis viral como se describió anteriormente.

Todavía en un aspecto adicional la invención se refiere a un estuche de ensayo que comprende al menos un medicamento según la invención, que contiene un componente de silibinina y al menos otro medicamento. Tanto el medicamento según la invención, que contiene un componente de silibinina, como el otro medicamento como se describió anteriormente, como en todas las realizaciones preferidas, son análogamente aplicables al estuche de ensayo según la invención.

En una realización preferida, el kit contiene tantos medicamentos (unidades de dosis individuales) como sea necesario con el fin de llevar a cabo una terapia secuencial, siendo inicialmente administrado el medicamento que contiene el componente de silibinina durante un primer periodo y siendo administrado posteriormente el otro medicamento durante un segundo periodo. Preferiblemente, el primer periodo comprende al menos 2 días, más Preferiblemente al menos 3 días, incluso más Preferiblemente al menos 4 días, lo más Preferiblemente al menos 5 días y, en particular, al menos 6 días. Preferiblemente el segundo periodo comprende al menos 2 días, más preferiblemente al menos 3 días, incluso más preferiblemente al menos 4 días, lo más preferiblemente al menos 5 días y en particular al menos 6 días.

En una realización particularmente preferida, la invención se refiere al uso de un componente de silibinina, Preferiblemente un éster de silibinina, para la producción de un medicamento, que es formulado para una administración parenteral, para el tratamiento de la hepatitis C viral en personas no sensibles con respecto a la terapia de ribavirina/interferón, es decir, en pacientes que no responden a una terapia de combinación inmunomoduladora/antiviral como una terapia de rebavirina/interferón.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un componente de silibinina, Preferiblemente un éster de silibinina, Preferiblemente para una administración parenteral, para el tratamiento de la hepatitis C. Las realizaciones preferidas del aspecto de la invención resultan evidentes a partir de la descripción anterior de las realizaciones preferidas de los otros aspectos de la invención y, por tanto, no se repiten.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al tratamiento de la hepatitis C, que comprende la administración, Preferiblemente administración parenteral, de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un componente de silibinina, Preferiblemente un éster de silibinina, a un sujeto que lo necesita. Las realizaciones preferidas del aspecto de la invención resultan evidentes a partir de la descripción anterior de las realizaciones preferidas de los otros aspectos de la invención y, por tanto, no se repiten.

Los ejemplos que siguen ilustran adicionalmente la invención, pero no están concebidos para limitarla en su alcance.

Ejemplo 1:

El componente de silibinina se administró por vía parenteral en forma del C-2',3-bi(hidrogenosuccinato) de silibinina (Legalon Sil®, Madaus, Colonia) (en lo que sigue denominado "silibinina").

Pacientes y métodos:

Pacientes	Protocolo 1	Protocolo 2
N (varón/mujer)	16 (14/2)	20 (17/3)
Edad media (años ± SD)	49,9 ± 9,7	52,7 ± 12,8
Genotipo (1/2/4)	15/-/1	17/1/2
Fase de fibrosis:		
0-2	3	10
3-4	13	7
No disponible	-	3
Terapia precedente		
PEG-interferon-alfa2a/RBV	14	18
PEG-interferon-alfa2b/RBV	2	4
Caída de registro a las 12 semanas de la terapia precedente		
>2**	3	4
1-2	4	1
<1	5	12
No disponible	2	3
	14	18
	2	4
* algunos pacientes tuvieron más de un ciclo de tratamiento ** todos fueron positivos en la semana 24		

Fueron seleccionados para estos estudios pacientes con insensibilidad previa a la dosis completa de la terapia de combinación de peginterón/ribavirina. La insensibilidad se definió como la ausencia de una caída del registro > 2 de carga viral después de 12 semanas de terapia y/o por no conseguir un final de respuesta al tratamiento. A los pacientes se les requirió tener una biopsia de hígado hecha en los dos antes de la inclusión en este estudio. Se aplicaron criterios estándar de inclusión/exclusión para la terapia de peginterferón/ribavirina.

Protocolo de estudio:

Durante una primera fase de selección en los 35 días anteriores a la primera dosis de fármaco de estudio se estableció la eligibilidad de los pacientes según criterios de inclusión/exclusión. Todos los pacientes tuvieron al menos un ensayo cuantitativo de HCV-ARN en los 6 meses anteriores a la fase de selección.

Protocolo 1: Los pacientes recibieron en primer lugar diariamente 10 mg/kg de silibinina (Legalon Sil®, Madaus, Colonia) infundida en 4 horas durante 7 días consecutivos. En el día 1 se extrajo sangre para la determinación de los parámetros de tensión oxidativa de referencia, cada 30 minutos durante la infusión y 2 horas después del final de la infusión. En el 8 el tratamiento se cambió a 140 mg de silimarina (Legalon®, Madaus, Colonia) TID por boca en combinación con 180 µg/semana de Peg/Fna-2a (PEGASYS®; Roche, Basilea) y 1-1,2 g/d de ribavirina (COPEGUS®; Roche, Basilea).

Protocolo 2: Después de obtener los resultados del primer protocolo, el tratamiento con silibinina se prolongó durante 2 semanas y se administraron dosis diferentes de silibinina. Los pacientes recibieron en primer lugar

diariamente 5, 10, 15 o 20 mg/kg de silibinina infundida en 4 horas durante 14 días consecutivos. El día 8 se comenzó un tratamiento con 180 µg/semana de Peg/Fna-2a y 1-1,2 g/d de ribavirina. Después del día 14 los pacientes recibieron 280 mg de silimarina (Legalon®, Madaus, Colonia) TID por boca. Durante el periodo de infusión de 14 días se obtuvo sangre diariamente para la determinación de la carga viral.

En ambos protocolos, en caso de intolerancia a PEG-IFN alfa2a o ribavirina, se usaron normas de ajuste de la dosis estándar. La terapia de combinación antiviral se proporcionó durante un total de 24 semanas (con la opción de detener el tratamiento en pacientes sin una caída del registro > 2 en la semana 12); a los que fueron sensibles virológicamente en la semana 24 se les ofreció continuar el tratamiento durante otras 48 semanas. Después de finalizar el periodo de infusión los pacientes fueron ensayados después de 2 y 4 semanas y seguidamente mensualmente hasta el final de la terapia en la semana 24.

El protocolo fue aprobado por el comité ético de la Universidad de Medicina de Viena. Los detalles del estudio fueron explicados a los pacientes y todos ellos firmaron un consentimiento informado.

Métodos:

Se determinó el nivel en suero de HCV-ARN mediante el ensayo PCR TaqMan (ensayo de HCV Cobas Ampliprep/ Cobas TaqMan; límite de detección, 15 UI/ml, Roche Diagnostics).

Los metabolitos oxidativos reactivos reactivos en sangre se midieron mediante el ensayo de d-ROMs (compuestos derivados de metabolitos de oxígeno reactivo; Diacron, Grosseto, Italia) y las cantidades de antioxidantes mediante el ensayo BAP (potencial antioxidante biológico; Diacron, Grosseto, Italia) usando el sistema de combinación de radicales libres portátil (FRAS 4, SEAC, Calenzano, Italia) con anterioridad, cada 30 minutos durante el mismo (en el día 1) y 2 horas después de las infusiones de silibinina. El ensayo d-ROM mide los metabolitos de oxígeno reactivos (principalmente hidroperoxidasas) liberados a partir de proteínas de plasma mediante un tampón ácido, que en presencia de hierro genera radicales alcoxilo y peroxilo, según la reacción de Fenton. Estos radicales, a su vez, son capaces de oxidar una amina aromática alquil-sustituida (N,N-dietilparafenilenodiamina), produciendo así un derivado de color rosa que es fotométricamente cuantificado a 505 nm. Los resultados para los metabolitos oxidativos reactivos se expresan en forma de unidades de Caratelli (Ucarr; normal: 250-300, 1 Ucarr=0,08 mg de peróxido de hidrógeno/dl). El ensayo de BAP mide la intensidad de decoloración de una solución de cloruro férrico mezclada con un derivado de tiocianato por la muestra de plasma añadida fotométricamente a 505 nm, que es proporcional a la capacidad de reducir iones férricos por las cantidades de antioxidantes en plasma (normal= 2.200 pM). La descripción de los ensayos por el fabricante no especifica que sustancias son realmente medidas.

Estadísticas:

Opcionalmente, el principal resultado variable fue la respuesta virológica definida como el porcentaje de pacientes que eran negativos a PCR al final del tratamiento (semana 24). Las variables de eficacia secundarias fueron las velocidades de respuesta virológica en la semana 12, la seguridad y tolerancia del tratamiento con PEG-IFN/ribavirina/silimarina, la calidad de vida de referencia en la semana 24, semana 48, semana 72 (SF-36, escala de gravedad del cansancio) y el estado oxidativo después de las infusiones de silibinina. Debido a la fuerza respuesta virológica inesperada después de 7 días de infusiones de silibinina, se detuvo la captación y el estudio se volvió a diseñar basándose en parámetros de respuesta virológica usando periodos de infusión más largos y dosis más elevadas de silibinina. Para el estudio original, el tamaño de las muestras se estimó basadas en el diseño de dos fases de Gehan. Según estudios previos, una tasa de respuesta > 10% parece que garantiza la investigación adicional del régimen de tratamiento. Tuvieron que ser captados 29 pacientes en la primera fase de forma consecuente (probabilidad de error β=5%).

Resultados:

Protocolo 1:

Se incluyeron 16 personas no sensibles seleccionadas (véase la tabla anterior para detalles). Todos los pacientes recibieron un tratamiento de dosis completo con interferón pegilado (12 peginterferón alfa 2a, 2 peginterferón alfa 2b) y ribavirina (1.000 - 1.200 mg/d) durante al menos 12 semanas. Los parámetros de la tensión oxidativa medidos no se alteraron durante las infusiones de silibinina (figura 1).

El ARN del HCV en suero cayó en todos los pacientes de una monoterapia SIL iv (figura 2) (referencia: 6,59 ± 0,53, día 8: 5,26 ± 0,81 registro de UI/ml, [media ± SD], p<0,001) con una caída media del registsro de 1,32 ± 0,55 en una semana. En paralelo, ALT disminuyó desde 162 ± 133 hasta 118 ± 107 U/1 (p=0,004). En todos los pacientes el ARN del HCV permaneció detectable al inicio de la terapia PegIFN/RBV. Tres pacientes declinaron la terapia de combinación PEGIFN/RBV. En 11 de los 13 pacientes restantes el ARN del HCV aumentó nuevamente después del final de las infusiones de silibinina a pesar del inicio de PegIFN/RBV. En la semana 12 todos los pacientes eran todavía positivos a ARN del HCV, pero 5 pacientes tuvieron una caída >2 del registro y continuaron el tratamiento (figura 3). Ninguno de ellos resultó negativo al ARN del HCV en la semana 24, un paciente tuvo una caída de 5,5 del registro y continuó el tratamiento por voluntad propia.

Protocolo 2:

Se incluyeron 20 personas no sensibles seleccionadas (véase la tabla anterior para detalles). Todos los pacientes recibieron un tratamiento de dosis completo con interferón pegilado (18 peginterferón alfa 2a, 4 peginterferón alfa 2b; 2 pacientes recibieron 2 trascursos de tratamiento) y ribavirina (1.000 - 1.200 mg/d) durante al menos 12 semanas.

La figura 4 muestra las características cinéticas virales en estos pacientes. La carga viral cayó continuamente. Después de 7 días de monoterapia de silibinina la dosis de 5 mg/kg fue marginalmente eficaz (n=3, caída del registro 0,55 ± 0,5), mientras que a 10 mg/kg (n=19 [incluidos los pacientes del protocolo 1], caída del registro 1,41 ± 0,59); 15 mg/kg (n=5, caída del registro2,11 ± 1,15) y dosis de 20 mg/día (n=9, 3,02 ± 1,01) condujeron a una disminución altamente significativa de la carga viral (p<0,001).

Después de 1 semana de terapia combinada de silibinina y peginterferón/ribavirina la carga viral disminuyó adicionalmente (caída log: 5 mg/kg: 1,63 ± 0,78; 10 mg/kg: 4,16 ± 1,28; 15 mg/kg: 3,69 ± 1,29; 20 mg/kg: 4,8 ± 0,89; total p<0,0001 frente a referencia) (figura 5). Dos de los 5 pacientes en el grupo de 15 mg/kg y 4 de los 9 pacientes en el grupo de 20 mg/kg tenían ARN del HCV <15 UI en el día 15. El ARN del HCV fue <15 UI/ml en 8 y 7 pacientes en la semana 4 (semana 5 del protocolo de estudio) y la semana 12 (semana 13 del protocolo de estudio) después del comienzo de PEGIFN/RBV, respectivamente. La terapia de combinación antiviral se continuó para todos los pacientes (figura 6).

Seguridad:

La silibinina generalmente fue bien tolerada. Cinco pacientes se quejaron de síntomas gastrointestinales leves (dolor abdominal: 5, diarrea: 2, náuseas: 1), dos de dolores de cabeza y uno de artralgia. Todos estos fueron valorados como leves por los pacientes y desaparecieron después del final de las infusiones; no se requirieron cambios en la dosificación. Todos los pacientes en los grupos de 15 y 20 mg/kg apreciaron una sensación de calor cuando comenzó la infusión, que desapareció en 30 minutos sin tratamiento. No se produjeron SAEs. En la monoterapia no se observaron cambios de hemoglobina, leucocitos, plaquetas y creatinina. Se observaron los efectos secundarios típicos de la terapia de combinación antiviral (incluido un paciente que sufría una disnea creciente debida a neumonía inducida por *hemophilus influenzae*, que requirió la terminación de la terapia de peginterferón/ribavirina después de 8 semanas.

Este ejemplo demuestra que la administración parenteral de silibinina (C-2',3-bis(hidrogenosuccinato)) tiene una actividad antiviral considerable contra el virus de la hepatitis C. Estas observaciones demuestran la capacidad potencial de este fármaco para un tratamiento de la hepatitis C crónica, particularmente enpersonas no sensibles.

Se encontró sorprendentemente que la silibinina iv (C-2',3-bis(hidrogenosuccinato)) es un agente antiviral potente en pacientes con hepatitis C crónica no sensibles a una terapia de combinación antiviral estándar. La silibinina intravenosa fue bien tolerada y no se observaron efectos adversos graves. El efecto secundario más comúnmente referido fue una sensación transitoria de calor. El efecto antiviral era dependiente de la dosis pero no se mantuvo después del final del periodo de infusión por la administración de silimarina.

En comparación, cantidades similares de silimarina proporcionadas por vía oral no tuvieron efecto sobre la carga de HCV (A Gordon *et al.*, J Gastroenterol Hepatol. 2006, 21, 275-80) reflejando diferencias en la biodisponibilidad y metabolismo de silibinina que daban lugar a niveles en plasma muy inferiores. Después de la dosificación oral de silimarina los flavonolignanos son rápidamente glucuronidados y rápidamente eliminados con semividas cortas (Z Wen *et al.*, Drug Metab Dispos. 2008, 36(1), 65-72).

Ejemplo 2:

Los pacientes fueron tratados continuamente con 180 µg de interferón alfa 2a y ribavirina basada en el peso. A pesar de este tratamiento, cinco pacientes fueron positivos al ARN del HCV después de 24 horas de terapia: tres pacientes varones y dos pacientes mujeres; cuatro pacientes con genotipo 1 de HCV y un paciente con genotipo 3a de HCV; tres pacientes con cirrosis.

Cuatro pacientes pueden ser considerados como desprovistos de inmunidad, mientras que un paciente puede ser considerado como con recaída con respecto a dos terapias previas (24 y 48 semanas).

En el transcurso del tratamiento continuado con 180 µg de peginterferón alfa 2a y ribavirina basada en peso, todos los pacientes fueron tratados al menos una vez durante 14 días consecutivos con 20 mg/kg/d de silibinina iv. Durante este periodo, se continuó la terapia de combinación con peginterferón/ribavirina.

La totalidad de los 5 pacientes resultó negativo a ARN del HCV.

La fig. 7 muestra el resultado para un paciente individual (varón, 55 años). Como se puede observar el peginterferón/ribavirina solo provoca una disminución de la carga viral desde aproximadamente un registro de

7 UI/ml hasta aproximadamente un registro de 4,5 UI/ml después de 24 semanas. El tratamiento conjunto con 20 mg/kg/día de bis(hidrogenosuccinato) de silibinina i.v. durante 14 días, sin embargo, condujo a una disminución enorme de la carga viral desde un registro de aproximadamente 4,5 UI/ml hasta un valor por debajo del límite de detección. Después del primer intervalo de administración de bis(hidrogenosuccinato) de silibinina parenteral, la carga viral aumentó nuevamente hasta aproximadamente 2 UI/ml que, sin embargo, pudo ser permanentemente disminuido por debajo del límite de detección mediante un segundo tratamiento conjunto con 20 mg/kg/día de bis(hidrogenosuccinato) de silibinina i.v. durante 14 días.

La fig. 8 muestra el resultado para otro paciente individual (mujer, 44 años). Como se puede observar, el peginterferón/ribavirina solo provoca una disminución de la carga viral desde un registro de aproximadamente 7 UI/ml hasta un registro de aproximadamente 5 UI/ml después de 30 semanas. El tratamiento conjunto con 20 mg/kg/día de bis(hidrogenosuccinato) de silibinina i.v. durante 14 días después de 30 semanas, sin embargo, condujo a una disminución enorme y permanente de la carga viral desde un registro de aproximadamente 4 UI/ml hasta un valor por debajo del límite de detección.

La fig. 9 muestra el resultado para un paciente individual (varón, 52 años). Como se puede observar, el peginterferón/ribavirina provoca una disminución eficaz de la carga viral desde un registro de aproximadamente 5 UI/ml hasta un valor próximo al límite de detección <15 UI/ml. El tratamiento conjunto con 20 mg/kg/día de bis(hidrogenosuccinato) de silibinina durante 14 días después de 72 semanas provocó una disminución adicional de la carga viral muy por debajo del límite de detección.

Estos ensayos clínicos demuestran que el tratamiento parenteral con un componente de silibinina durante un intervalo de tiempo comparativamente corto apoya y mejora significativamente el tratamiento convencional mediante peginterferón/ribavirina. Parece que la administración parenteral del componente de silibinina (re)activa la susceptibilidad de los pacientes al tratamiento convencional mediante peginterferón/ribavirina (figuras 7 y 8) y/o mejora el efecto antiviral del tratamiento convencional mediante peginterferñon/ribavirina (figura 9).

Ejemplo 3:

Se realizó un estudio *in vivo* para caracterizar los perfiles de concentración en plasma/tiempo de silibinina en 8 pacientes que padecían hepatitis C crónica que recibieron un tratamiento de infusión i.v. de 7 días con 20 mg de silibinina/kg de peso corporal (Legalon® SIL). Para dosis múltiples de 20 mg/kg de peso corporal, se observaron los perfiles de concentración en plasma/tiempo y los parámetros PK de silibinina libre y total en el día 1 (=condiciones de dosis única) y se compararon con los del día 7 (=condiciones de estado estacionario esperado).

Procedimiento analítico:

Se analizaron muestras de estudio usando un método de HPLC-UV validado. Durante el periodo de ensayo el procedimiento analítico fue validado mediante dos curvas de calibración por experimento analítico. La inspección de los cromatogramas los datos presentados en las curvas de calibración y las muestras de control de calidad indica que el resultado de las determinaciones de las concentraciones de silibinina A y silibinina B total y libre para el estudio son fiables.

Las características de PK se resumen en la siguiente tabla:

Silibinina total	Día 1		Día 7	
	Silibinina A	Silibinina B	Silibinina A	Silibinina B
AUC(0-∞) [h ng/ml]	61.733 ± 27.489	13.745 ± 76040	-	-
AUC(0-tz) [h ng/ml]	50.019 ± 20.048	10.9038 ± 51.342	-	-
AUCss [h ng/ml]	-	-	84.299 ± 25.111	150.780 ± 47.780
C_{min} [h ng/ml]	-	-	1.967 ± 831	3.311 ± 61.426
C_{max} [ng/ml]	4.550 ± 928	9.539 ± 2.843	5.791 ± 977	11.083 ± 62.269
C_{av} [ng/ml]	-	-	3.512 ± 1.046	6.282 ± 1.991
$t_{1/2}$ [ng/ml]	8,30 ± 2,26	8,29 ± 2,98	13,32 ± 3,66	12,02 ± 2,91
HVD [h]	9,28 ± 3,36	9,47 ± 3,29	15,20 ± 4,09	13,17 ± 3,62
MRT [h]	13,17 ± 3,74	13,44 ± 4,39	19,22 ± 5,28	17,34 ± 4,20

Silibinina total	Día 1		Día 7	
	Silibinina A	Silibinina B	Silibinina A	Silibinina B
CL [ml/(h kg)]	0,435 ± 0,336	0,233 ± 0,237	0,269 ± 0,128	0,156 ± 0,091
Vz [ml/kg]	4,7 ± 1,3	2,4 ± 1,1	4,67 ± 0,73	2,43 ± 0,55
t_{max} [h]	4,14 ± 0,18	4,17 ± 0,18	-	-
%PTF [%]	-	-	121,89 ± 54,43	137,59 ± 52,51

Silibinina libre	Día 1		Día 7	
	Silibinina A	Silibinina B	Silibinina A	Silibinina B
AUC(0-□) [h ng/ml]	3.614 ± 1.648	753 ± 397	-	-
AUC(0-tz) [h ng/ml]	3.302 ± 1.551	559 ± 339	-	-
AUCss [h ng/ml]	-	-	4.095 ± 1.942	1.041 ± 627
C_{min} [h ng/ml]	-	-	59 ± 40	3,3 ± 8,7
C_{max} [ng/ml]	316 ± 108	90 ± 44	315 ± 119	120 ± 54
C_{av} [ng/ml]	-	-	171 ± 81	43 ± 26
$t_{1/2}$ [ng/ml]	4,58 ± 1,35	5,16 ± 4,96	6,85 ± 1,29	4,35 ± 1,66
HVD [h]	10,12 ± 4,29	6,09 ± 2,14	11,87 ± 2,64	7,17 ± 1,63
MRT [h]	8,49 ± 2,64	8,81 ± 6,12	9,88 ± 1,86	6,2762,39
CL [ml/(h kg)]	7,0 ± 4,2	44,8 ± 42,5	5,9 ± 2,9	26,8 ± 16,7
Vz [ml/kg]	51,4 ± 12,7	285,8 ± 163,9	55,3 ± 18,5	140,4 ± 49,0
t_{max} [h]	3,73 ± 1,22	4,03 ± 0,04	-	-
%PTF [%]	-	-	164,00 ± 45,33	305,24 ± 80,46

Ejemplo 4:

Se realizó un estudio *in vitro* para valorar la capacidad potencial citotóxica de silimarina, silibinina, sal de disodio de bis(hidrogenosuccinato) de silibinina y ácido succínico por medio del ensayo XTT usando la línea celular de ratón L929 (véanse D.A. Scudiero *et al.*, Cancer Res. 48, 4827-33; O.S. Weislow *et al.*, J. Natl. Cancer Inst., 81, 577-86; N.W. Roehm *et al.*, J. Immunol. Methods, 142).

Se ensayaron las siguientes concentraciones de los artículos del ensayo: 9,77, 19,53, 39,06, 78,13, 156,25, 312,5, 625, 1.250 µg/ml. Se usó medio completo (RPMI 1640 que contenía 10% de FCS (v/v)) como testigo negativo. El testigo de disolvente para el artículo del ensayo fue medio RPMI 1640 que contenía 10% (v/v) de FCS y 1% de DMSO. El testigo de disolvente para el testigo positivo fue también medio RPMI 1640 que contenía 10% (v/v) de FCS y 10,0% (v/v) de agua desionizada. Se usó SDS como testigo positivo Se aplicaron las siguientes concentraciones: 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 125, 250 µg/ml. El tiempo de incubación fue de 24 horas a 37 ± 1,5 ºC.

El testigo negativo y el testigo de disolvente no mostraron reducción en la viabilidad celular. El testigo positivo (SDS) indujo una reducción relacionada con dosis distintas en la viabilidad celular.

Se observaron efectos tóxicos a continuación de la incubación con silimarina desde 39,06 µg/ml hasta la concentración más elevada ensayada (1.250 µg/ml). El valor de XTT_{50} calculado es de 35,2 µg/ml.

Se observaron efectos tóxicos a continuación de la incubación con silibinina desde 78,13 µg/ml hasta la concentración más elevada ensayada (1.250 µg/ml). El valor de XTT_{50} calculado es de 67,5 µg/ml.

No se observaron efectos citotóxicos relevantes a continuación de la incubación con sal de sodio de bis(hidrogenosuccionato) de silibinina hasta la concentración más elevada ensayada (1250 µg/ml). Debido a la falta de citotoxicidad, el valor de XXT_{50} no pudo ser calculado.

No se observaron efectos citotóxicos relevantes a continuación de la incubación con ácido succínico hasta la concentración más elevada ensayada (1250 µg/ml). Debido a la falta de citotoxicidad, no pudo ser calculado un valor de XXT_{50}.

Estos experimentos pusieron de manifiesto que bajo las condiciones dadas, la capacidad potencial citotóxica de silimarina es casi un 100% mayor que la capacidad potencial citotóxica de silibinina. Por tanto, se puede esperar que la silibinina puede ser administrada en dosis más elevadas que la silimarina sin provocar efectos secundarios adversos graves.

Ejemplo 5:

La RNA-polimerasa dependiente de ARN de NS5B (RdRp) es una enzima esencial para la replicación viral (S.B. Hwang *et al.*, Virology 1997, 227, 439-46). Se ensayaron los siguientes compuestos puros en un ensayo enzimático exento de células para la detección de la actividad de RdRp de HCV: silibinina A, silibinina B, isosilibinina A, isosilibinina B, silicristina, silidianina y el éster de silibinina de sal de disodio de C-2',3-bis(hidrogenosuccinato) de silibinina (ingrediente activo de Legalon® SIL).

Se prepararon soluciones madre (100 mM) de los compuestos en DMSO al 100%. La concentración de DMSO en todas las reacciones se mantuvo constante a 5%. La enzima diana para el estudio fue HCV NS5BΔ21 polimerasa genotipo J4 (1b).

La figura 11 muestra los datos generados para los seis constituyentes purificados de silimarina (es decir, silibinina A, silibinina B, isosilibinina A, isosilibinina B, silicristina y silidianina). La figura 12 muestra los datos respectivos para el éster de silibinina. El éster de silibinina se reveló como el más eficaz.

El valor de IC_{50} para el éster de silibinina se determinó a partir de la curva de respuesta a la dosis de dos mediciones. El valor de IC_{50} determinado 47 ± 14 µM. Las curvas se ajustaron a los puntos de los datos y los valores de IC_{50} fueron interpolados a partir de las curvas resultantes usando el software SigmaPlot 8.0.

REIVINDICACIONES

1. Un componente de silibinina para ser usado en el tratamiento de hepatitis C en un paciente que no responde a una terapia de ribavirina/interferón, en que el componente de silibinina es proporcionado como un medicamento, en que el medicamento está esencialmente exento de al menos una de las sustancias seleccionadas entre el grupo que consiste en silidianina, silicristina e isosilibinina, en que *esencialmente exento* significa que el contenido residual de la sustancia es de menos de 2,0% en peso, basado en el peso total del medicamento.

2. El componente de silibinina para ser usado según la reivindicación 1, en que el paciente experimentará o ha experimentado un trasplante de hígado.

3. El componente de silibinina para ser usado según la reivindicación 1 o 2, que es administrado por vía oral.

4. El componente de silibinina para ser usado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es proporcionado como un medicamento seleccionado entre el grupo que consiste en comprimidos, cápsulas, comprimidos revestidos de azúcares, granulados y bolsitas.

5. El componente de silibinina para ser usado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es proporcionado como un medicamento que contiene una ciclodixtrina y/o un fosfolípido.

6. El componente de silibinina para ser usado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para una administración una vez al día, dos veces al día o tres veces al día.

7. El componente de silibinina para ser usado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es administrado en una dosis de al menos 50 mg, basada en silibinina.

8. El componente de silibinina para ser usado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es para la reducción de la carga de virus en pacientes de hepatitis C.

Figura 1

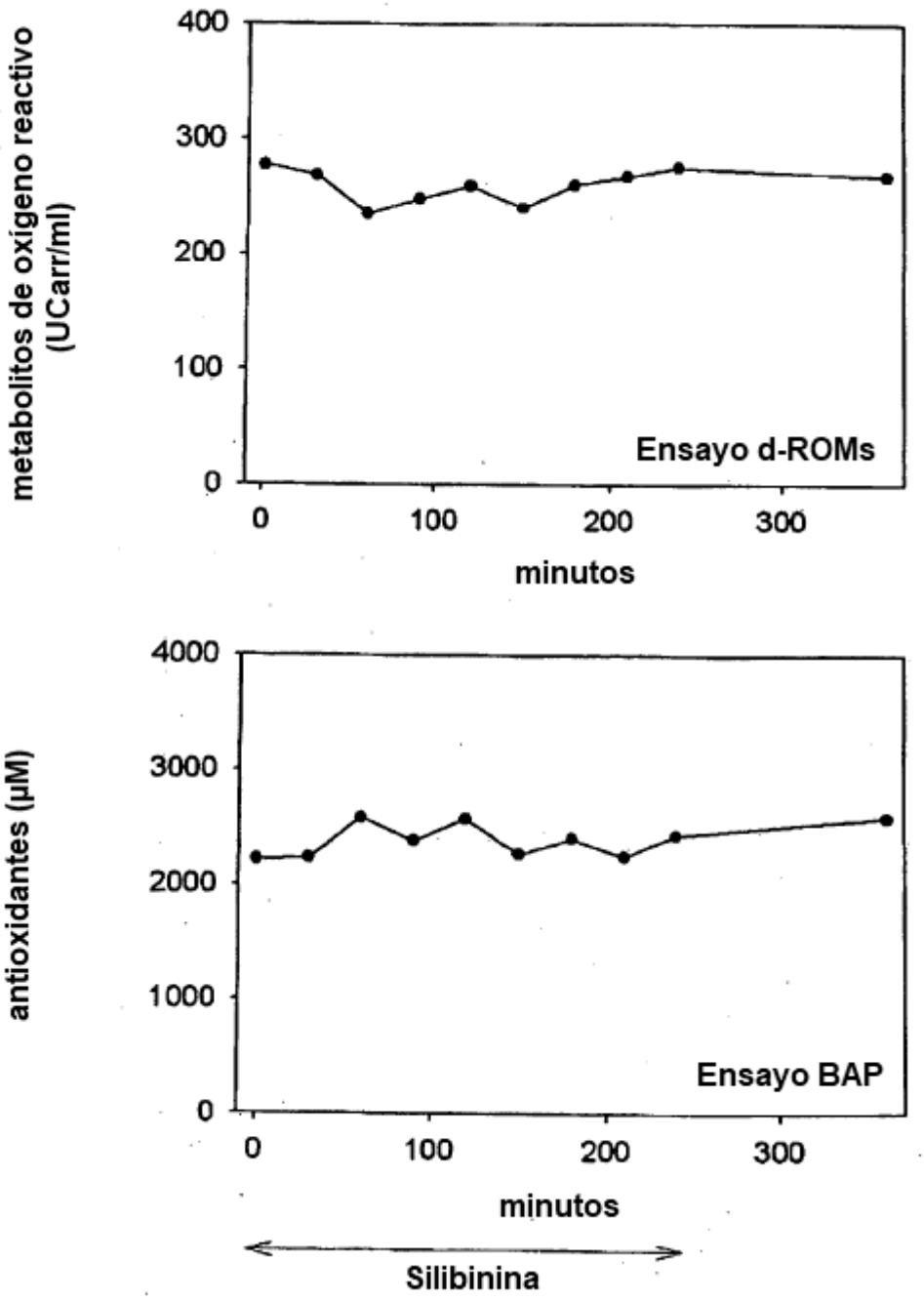

metabolitos de oxígeno reactivo (UCarr/ml)
400
300
200
100
0
Ensayo d-ROMs
0
100
200
300
minutos
antioxidantes (µM)
4000
3000
2000
1000
0
Ensayo BAP
0
100
200
300
minutos
Silibinina

Figura 2

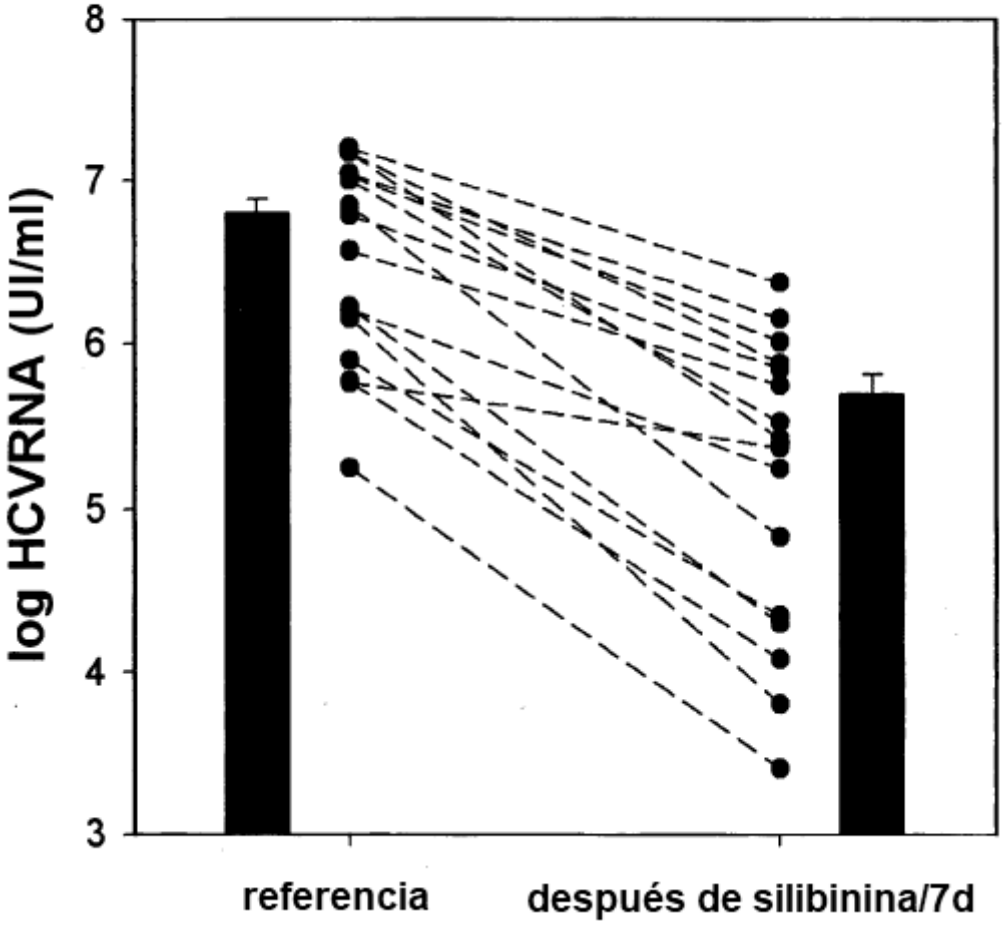

8
7
6
5
4
3
log HCVRNA (UI/ml)
referencia
después de silibinina/7d

Figura 3

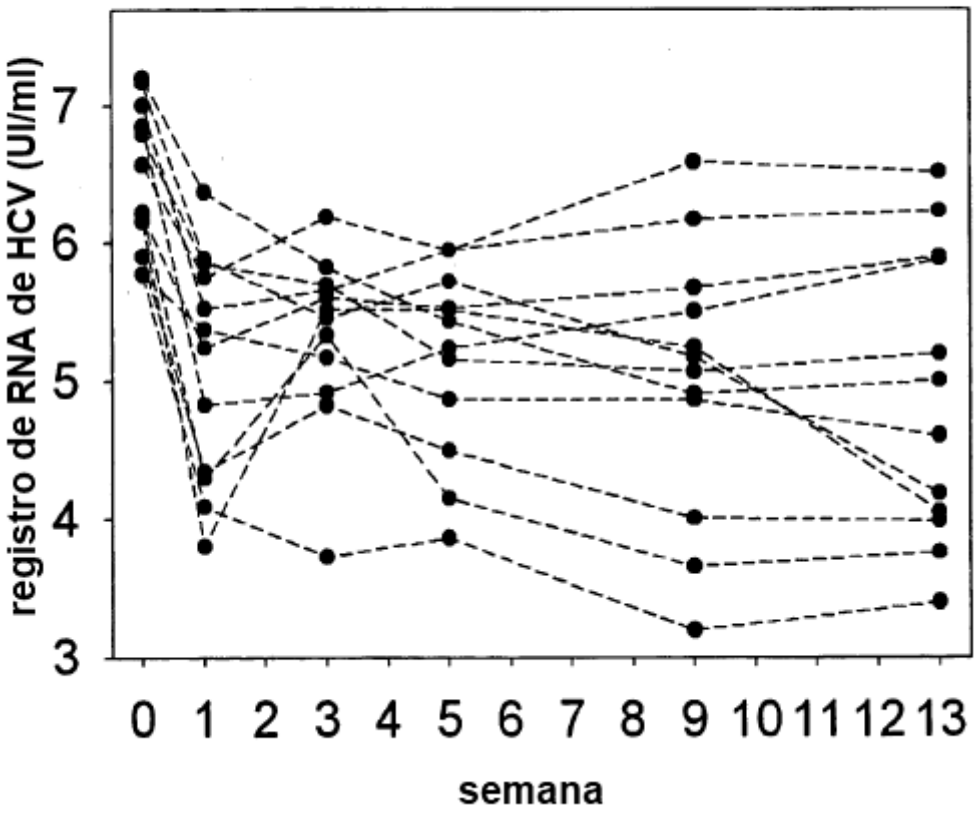

registro de RNA de HCV (UI/ml)
7
6
5
4
3
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
semana

Figura 4

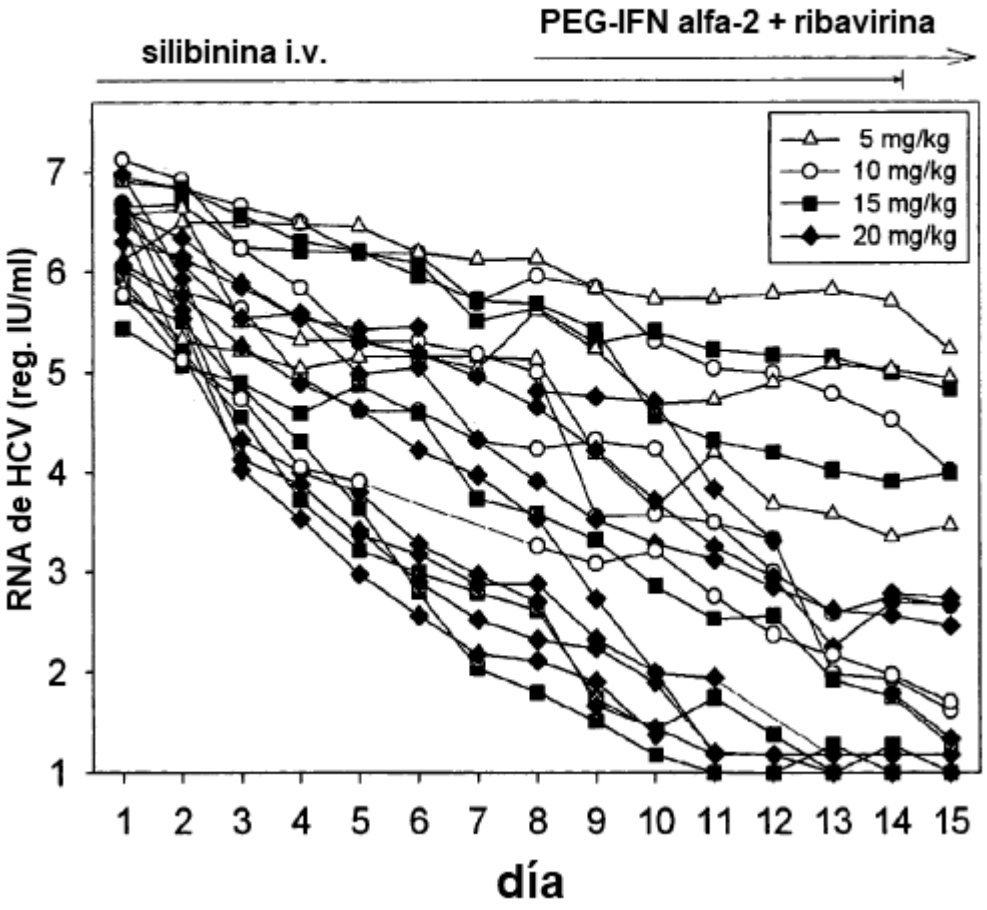
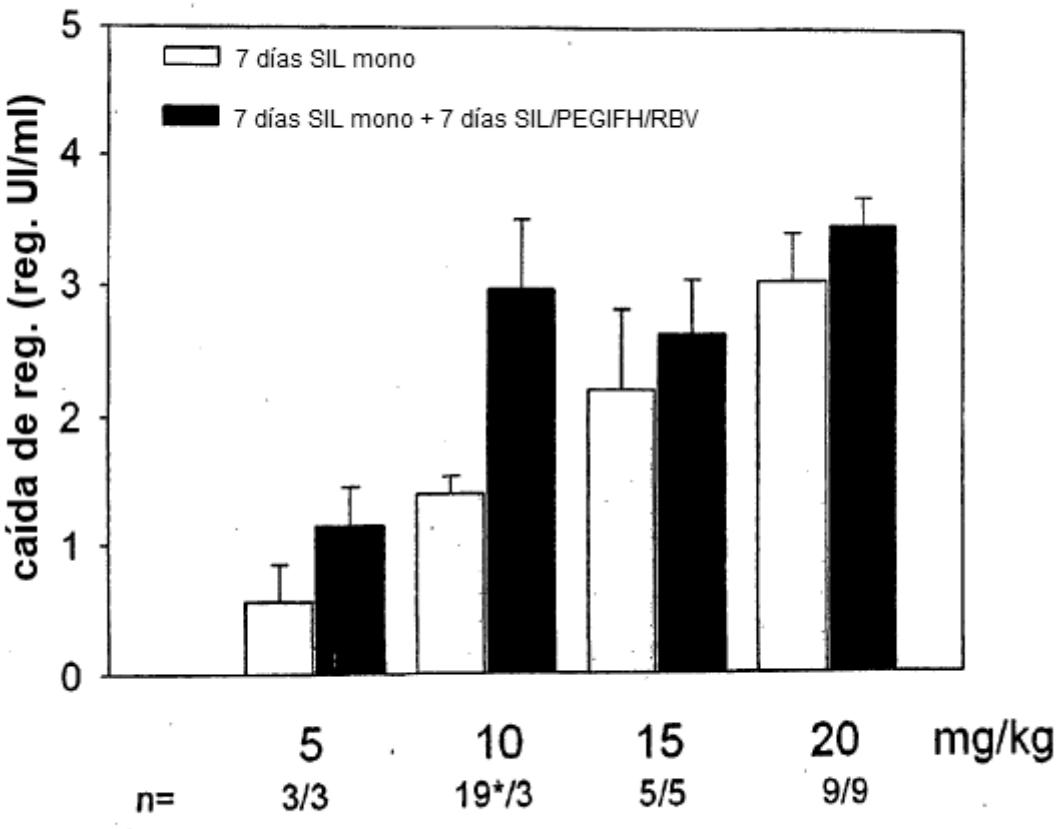

PEG-IFN alfa-2 + ribavirina
silibinina i.v.
5 mg/kg
10 mg/kg
15 mg/kg
20 mg/kg
RNA de HCV (reg. IU/ml)
7
6
5
4
3
2
1
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
día

Figura 5



*** incluye pacientes en el estudio 1**

Figura 6

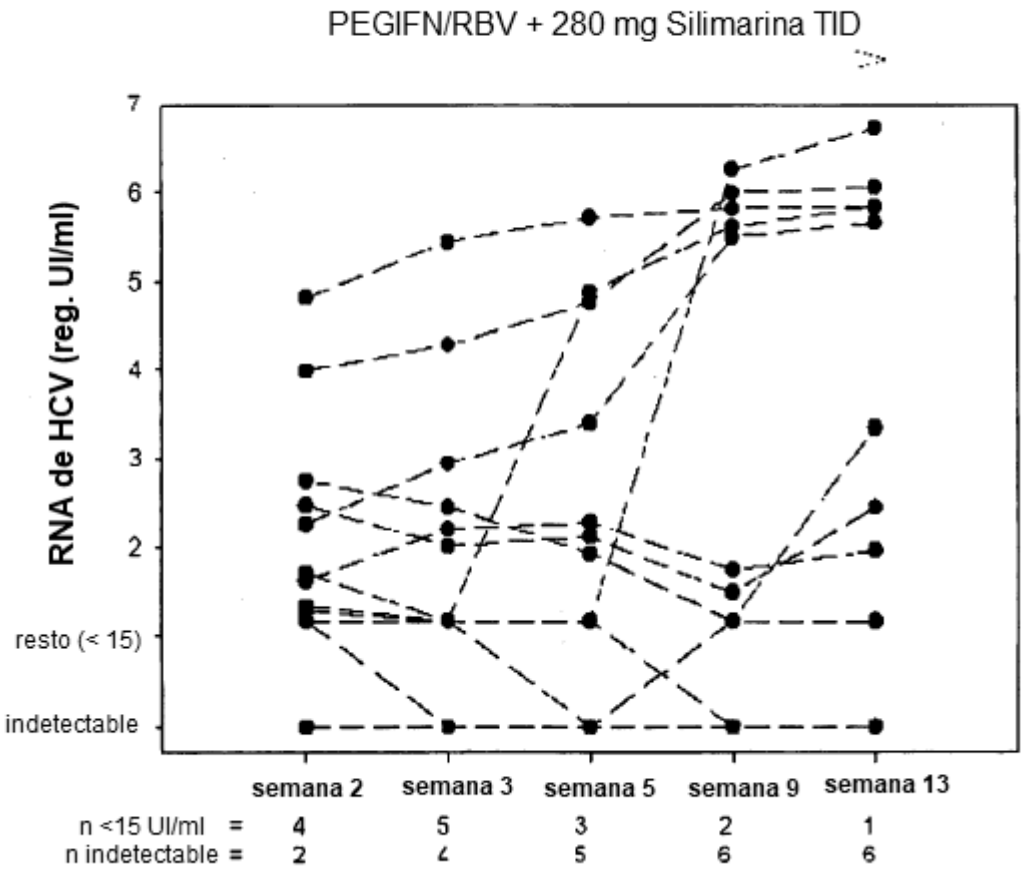

PEGIFN/RBV + 280 mg Silimarina TID
RNA de HCV (reg. UI/ml)
7
6
5
4
3
2
resto (< 15)
indetectable
semana 2
semana 3
semana 5
semana 9
semana 13
n <15 UI/ml = 4 5 3 2 1
n indetectable = 2 4 5 6 6

Figura 7

Pat. HO, m, 55 a

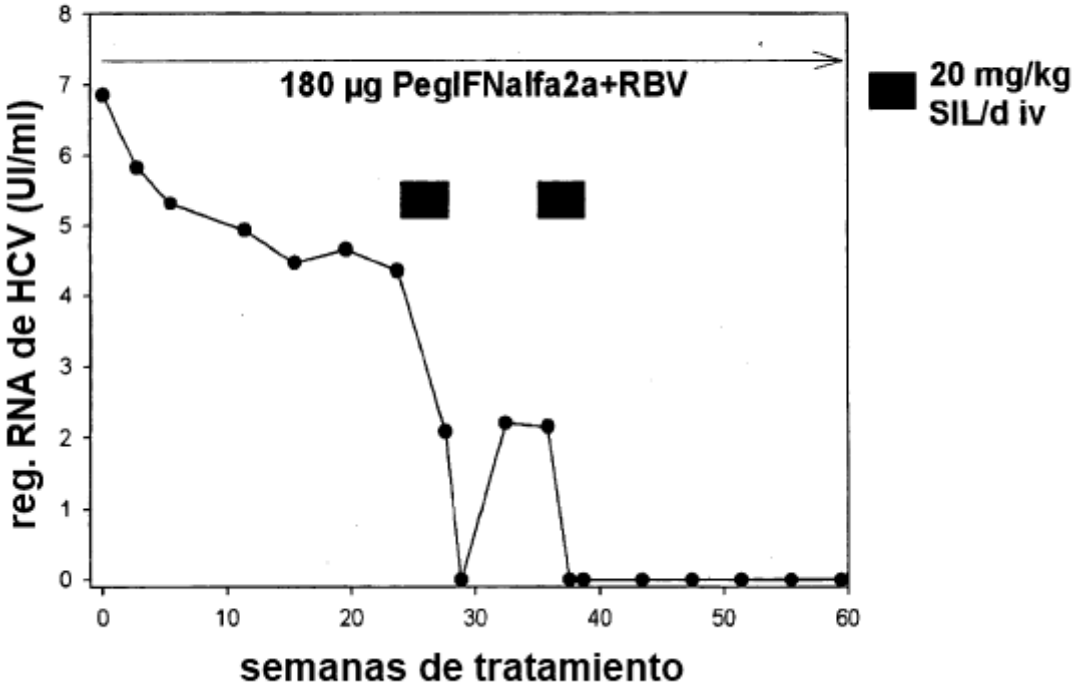


Figura 8

TM,f,44a

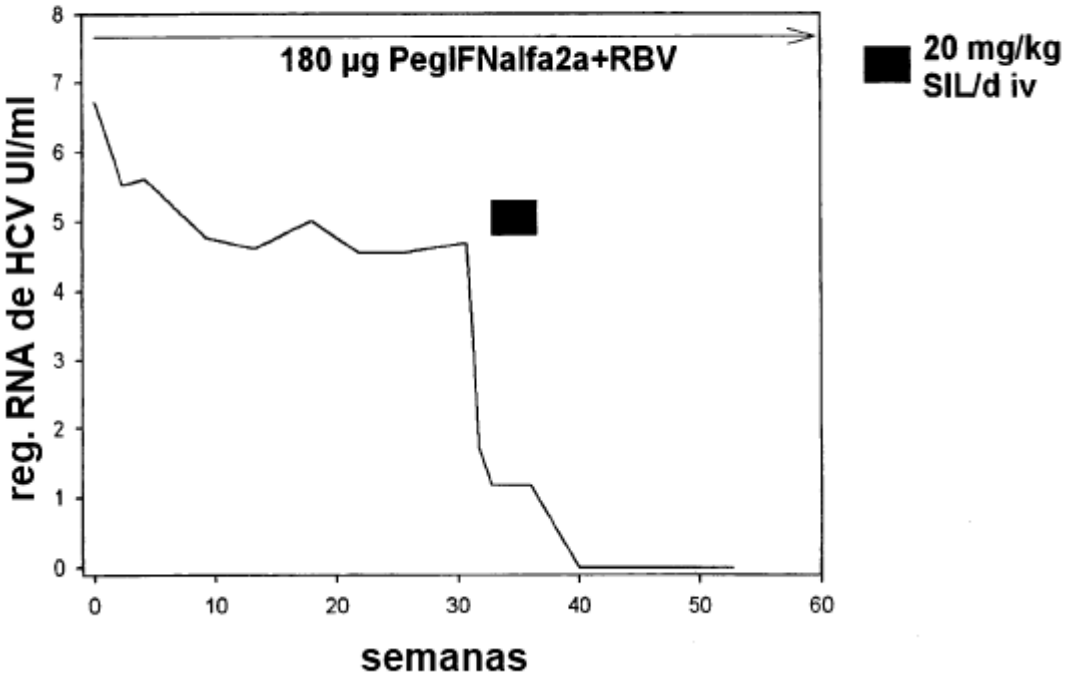


Figura 9

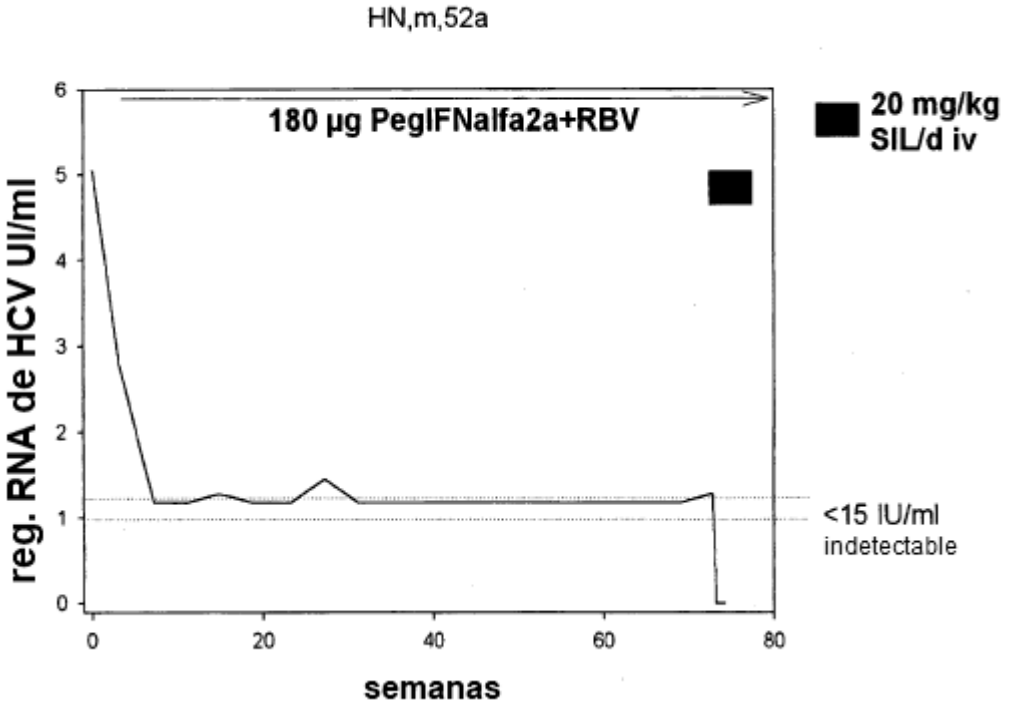

HN,m,52a
180 µg PegIFNalfa2a+RBV
20 mg/kg SIL/d iv
reg. RNA de HCV UI/ml
6
5
4
3
2
1
0
<15 IU/ml
indetectable
0
20
40
60
80
semanas

Figura 10

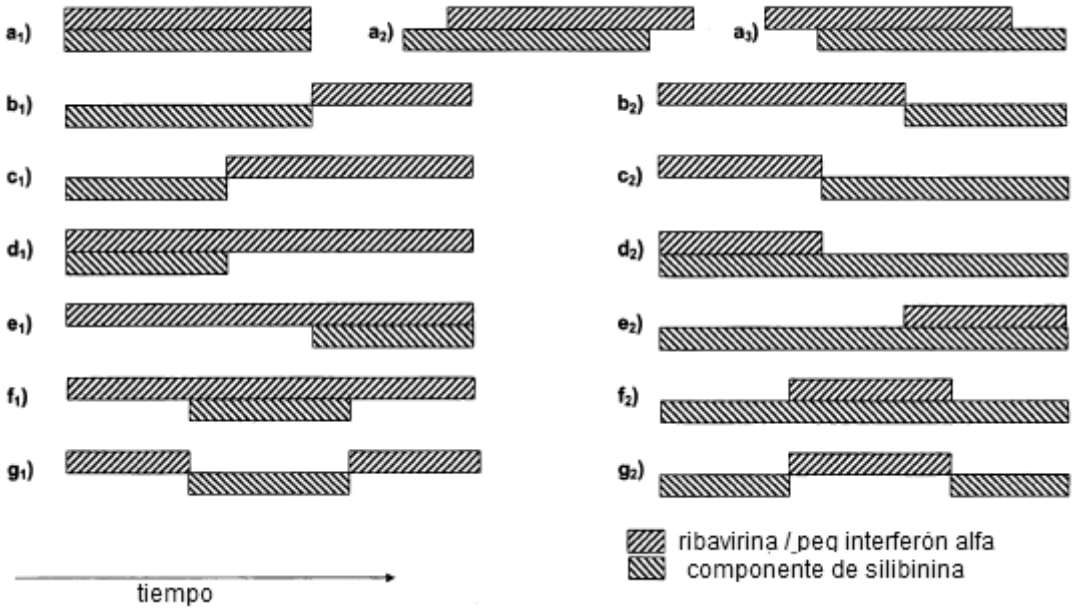

a1)
a2)
a3)
b1)
b2)
c1)
c2)
d1)
d2)
e1)
e2)
f1)
f2)
g1)
g2)
ribavirina / peg interferón alfa
componente de silibinina
tiempo

Figura 10 (continuación)

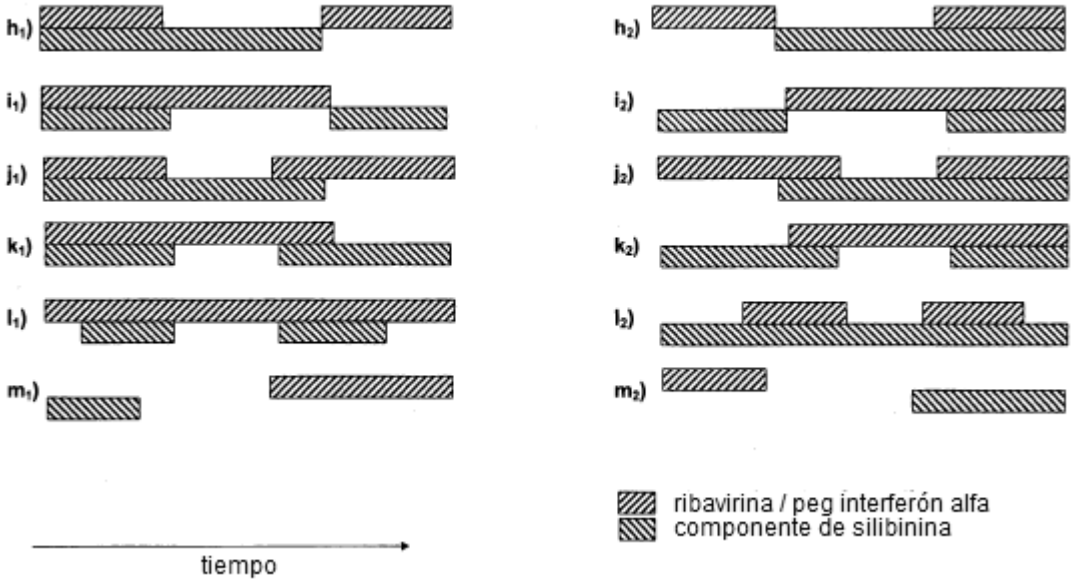
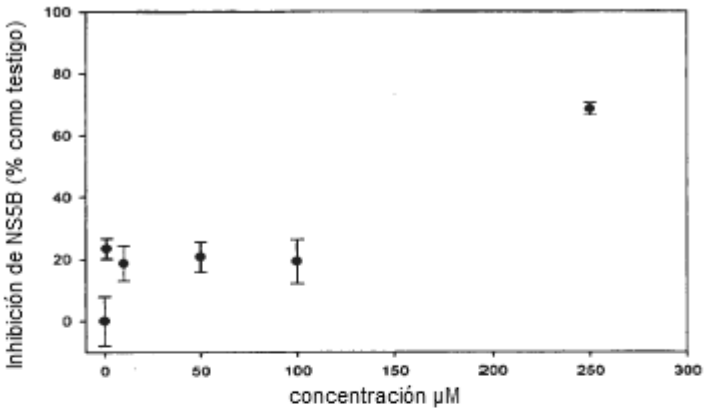
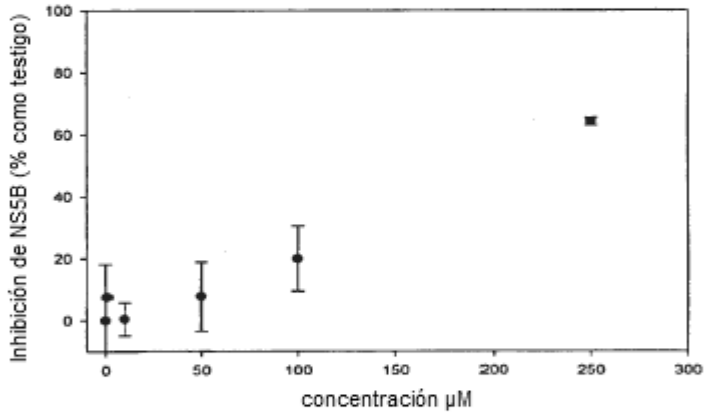


Figura 11

Silibinina A



Silibinina B



Isosilibinina A

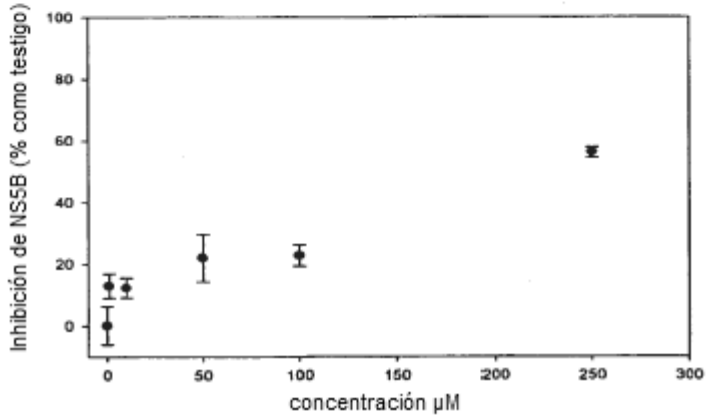
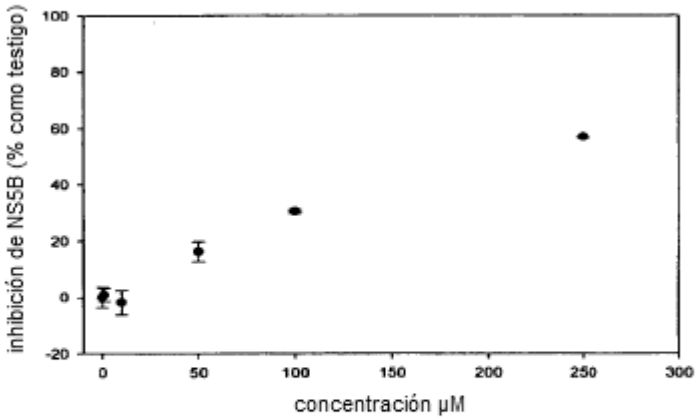
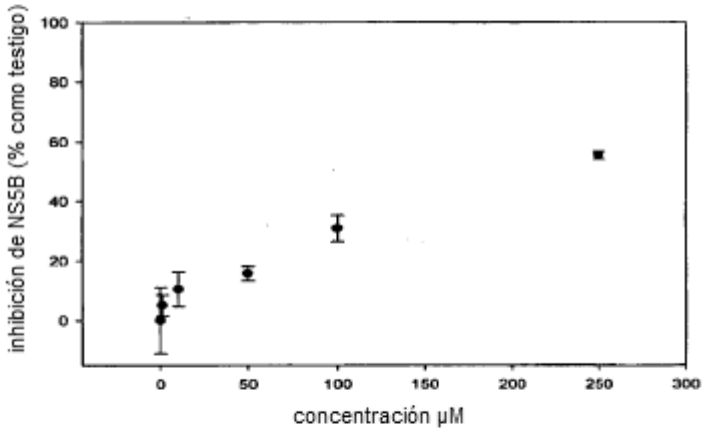


Figura 11 (continuación)

Isosibilina B



Silicristina



Silidianina

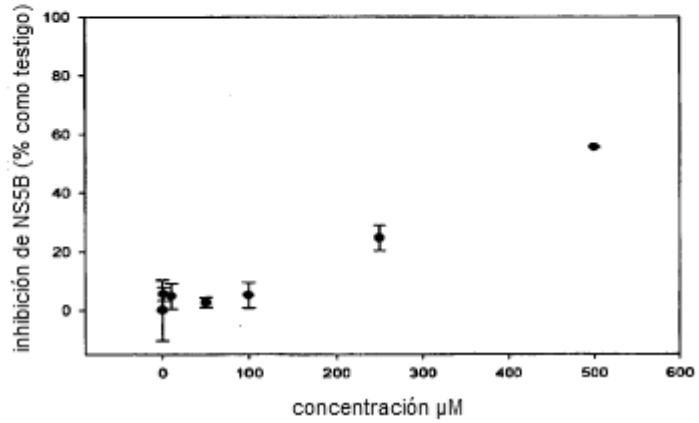
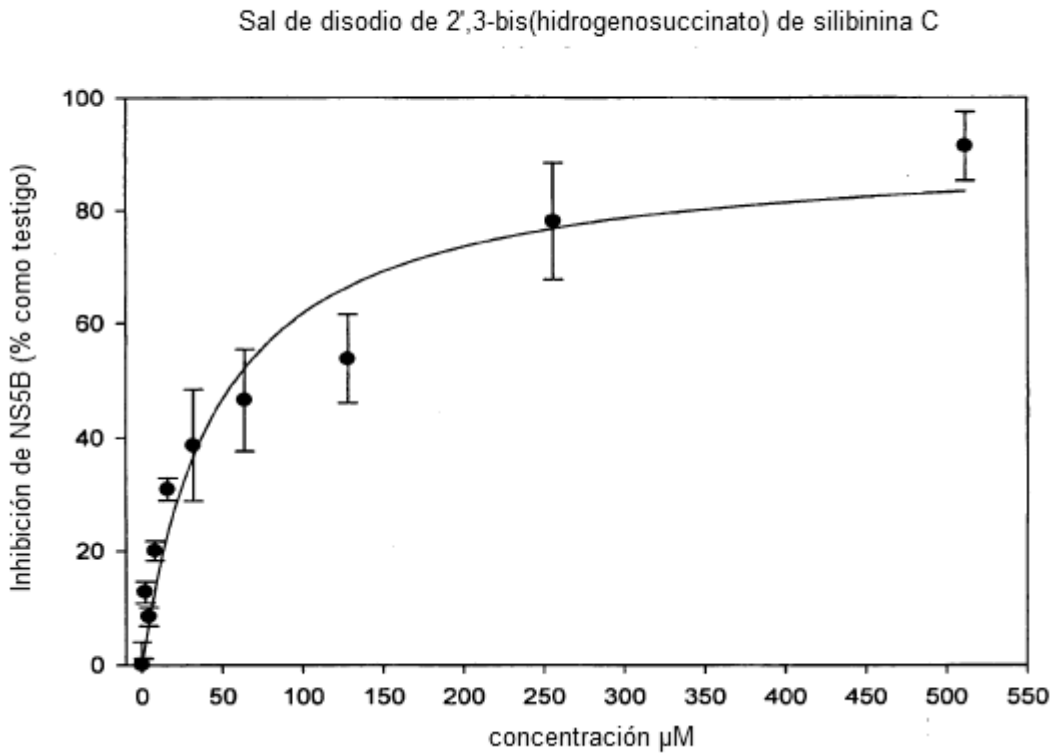


Figura 12


Sal de disodio de 2',3-bis(hidrogenosuccinato) de silibinina C
Inhibición de NS5B (% como testigo)
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
concentración µM