

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 326 065**

21 Número de solicitud: 200800873

51 Int. Cl.:

A61K 31/56 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **28.03.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2009**

Fecha de la concesión: **23.06.2010**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **08.07.2010**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
08.07.2010

73 Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones
Científicas (CSIC)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Nieto Callejo, María Luisa;
Martín Montaña, Rubén;
Carvalho Tavares, Juliana y
Ruiz Gutiérrez, Valentina**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Utilización de un triterpeno pentacíclico para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la esclerosis múltiple.**

57 Resumen:

Utilización de un triterpeno pentacíclico para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la esclerosis múltiple.

El ácido oleanólico (ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico) es un ácido triterpénico pentacíclico presente en un amplio número de plantas medicinales. El objeto de la invención es la aplicación farmacológica del ácido oleanólico solo o en combinación con otras sustancias en la terapéutica o profilaxis de enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis múltiple. Los inventores han encontrado que el ácido oleanólico administrado diariamente por vía intraperitoneal reduce significativamente los síntomas neurológicos e inmuno-inflamatorios asociados a la encefalomiélitis auto inmune experimental, un modelo experimental de la esclerosis múltiple, retardando el inicio y reduciendo el progreso de la enfermedad.

ES 2 326 065 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Utilización de un triterpeno pentacíclico para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la esclerosis múltiple.

Sector de la técnica

El objeto de la invención es la aplicación farmacológica del ácido oleanólico en la terapia de enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis múltiple. La invención pone de manifiesto la capacidad de este compuesto natural presente en la cutícula de aceituna y en la hoja del olivo, así como en los aceites donde estas fracciones tienen una presencia importante (aceite de orujo de oliva), para atenuar de forma notable los signos clínicos de la encefalomiелitis autoinmune experimental (en adelante EAE). Esta acción va asociada a una ganancia de peso y supervivencia de los animales de experimentación y a una disminución de la inflamación y permeabilidad cerebrovascular. Por tanto, es un objeto de esta invención proporcionar una composición farmacéutica y/o nutracéutica con aplicaciones para tratar la Esclerosis Múltiple (en adelante EM).

Estado de la técnica

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune, inflamatoria y degenerativa del sistema nervioso central (SNC): cerebro y médula espinal. Afecta principalmente a adultos jóvenes y predomina en el sexo femenino con un pico de manifestación a los 30 años de edad. Aunque es más común en mujeres, la severidad de la enfermedad es más acentuada en los portadores del sexo masculino. Clínicamente se caracteriza por la presencia de placas o lesiones de desmielinización en la sustancia blanca del SNC y como consecuencia la conducción nerviosa tiene lugar de forma anormal afectando principalmente al control muscular. Los signos y síntomas son diversos, dependiendo de la localización de las lesiones. Así, i) los síntomas motores pueden incluir impedimento del habla, debilidad, falta de coordinación, temblor y dificultad al caminar, ii) los síntomas sensoriales pueden incluir sensación de adormecimiento, hormigueos, dolor y alteraciones visuales y iii) los síntomas psicológicos pueden incluir cambios en el estado de ánimo, y depresión. En la mayoría de los pacientes, la enfermedad se manifiesta durante o después de una fase precedente de recaídas y remisiones, mientras en un pequeño porcentaje de pacientes (10-15%), la evolución de la enfermedad es progresiva desde el principio. Los ataques van a conducir a un proceso continuo de desmielinización y remielinización, lo cual produce cicatrización de las fibras nerviosas y una incapacidad progresiva. Aunque la causa exacta de la enfermedad es todavía desconocida, diversos estudios han apoyado la hipótesis de una etiología viral, sin embargo ninguno de los virus estudiados se ha revelado como el agente causal buscado. Por ello las teorías actuales sugieren que la etiología de la EM puede estar relacionada con una combinación de factores de autoinmunidad, medioambientales, víricos y de predisposición genética.

El mejor modelo animal disponible para estudiar la EM es la encefalomiелitis autoinmune experimental, y es una enfermedad desmielinizante inflamatoria del SNC en roedores, que comparte con la EM características clínicas, patogénicas e histopatológicas (Raine *et al.* Lab Invest. 1980, 43: 150-7). En este modelo la inmunización del SNC se consigue mediante la inyección de antígenos específicos (proteína básica de la mielina, proteína proteolípido de la mielina, o glicoproteína de oligodendrocito de la mielina) y adyuvantes, que inducen un ataque mediado por células T en el cerebro y en la médula espinal (Pettinelli and McFarlin, J. Immunol. 1981, 127: 1420-1423). Así, en el SNC de los animales con EAE se observan infiltrados inflamatorios perivasculares y parenquimatosos constituidos principalmente por células T (CD8+ e CD4+), células B y macrófagos activados que han atravesado la barrera hemato-encefálica (BHE), debido a alteraciones en su permeabilidad. Posteriormente, se produce la activación de células residentes como la microglía y los astrocitos (Schonrock L.M. *et al.* Neuropathol Appl Neurobiol. 1998, 24: 320-30). En función de la especie y/o cepa animal y el antígeno utilizado, las lesiones inflamatorias pueden ir acompañadas o no de áreas de desmielinización. Uno de los rasgos característicos de la EAE es la progresiva pérdida de peso durante la fase clínica de la enfermedad, la cual se revierte rápidamente cuando los animales se recuperan (Ruuls *et al.*, J. Immunology, 1996, 157:5721-5731). La recuperación está también asociada con la producción de citocinas desreguladoras, tales como la IL-10 y el TGF- (Kennedy *et al.*, J. Immunol. 1992, 149:2496-2505).

Los tratamientos más corrientemente disponibles para la esclerosis múltiple tienen la intención de suprimir el componente inmuno-inflamatorio de la enfermedad. Actualmente, el trastorno se trata sintomáticamente con la administración en dosis altas de glucocorticoides en el momento de la aparición de los episodios agudos con síntomas neurológicos. Sin embargo, debido a los numerosos y graves efectos secundarios de los corticoides, no es posible llevar a cabo una terapia preventiva continua. Algunos pacientes reciben también inmunosupresores, aunque a menudo son deficientemente tolerables.

Queda por tanto la necesidad de identificar nuevos tratamientos para la EM que resuelvan los problemas anteriormente mencionados y que puedan tratar, minimizar o ralentizar la progresión de la enfermedad.

Así, la investigación farmacológica está enfocada en hallar novedosos agentes terapéuticos, y en los últimos años el Reino Vegetal está demostrando ser una excelente fuente de recursos para el hallazgo de esos nuevos compuestos. Incluso, se han desarrollado múltiples líneas de investigación que pretenden analizar los efectos beneficiosos de los compuestos naturales presentes en los vegetales, con el objeto de relacionar la composición de la dieta con el desarrollo/modulación de enfermedades de base inmuno/inflamatoria y poder definir posibles estrategias terapéuticas nutricionales. En este contexto, el ácido oleanólico es un triterpeno pentacíclico del grupo de los oleananos presente

ES 2 326 065 B1

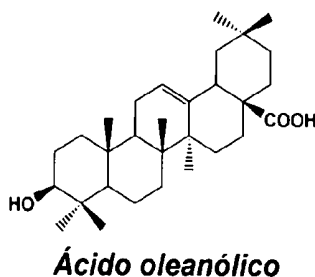
en plantas frecuentemente utilizadas en la medicina tradicional de diversos países. Se encuentra en forma de ácido libre o bien como aglicona de saponinas triterpenoideas (Liu J., *J Ethnopharmacol* 1995, 49: 57-68) y ha sido aislado de distintas especies vegetales, destacándose su presencia en *Olea europaea*.

- 5 Existen publicaciones desde el año 1906 (Canzoneri F., *Gazz chim ital*, 1906; 36:372) que reconocen al ácido oleanólico como constituyente permanente de hojas y frutos del olivo. En el olivo, se halla principalmente en hojas, frutos verdes, especialmente en la cutícula, y en las leñas residuales procedentes del aderezo de las aceitunas. Se encuentra además en aceitunas maduras, aceite de oliva virgen y aceite de orujo.
- 10 Son numerosas las publicaciones sobre las propiedades terapéuticas de los compuestos triterpénicos y en particular sobre el ácido oleanólico hay múltiples estudios que recogen sus actividades biológicas y farmacológicas. Entre ellas destacan: actividad hepatoprotectora (Liu Y *et al.*, *Toxicology Letters* 1998, 95: 77-85), antiinflamatoria (Mañez S *et al.* *Eur J Pharmacol.* 1999, 334: 103-5; Marquez-Martin A *et al.* *Cytokines.* 2006), antitumoral (Martín R. *et al.* *Cancer Res.* 2007, 67: 3741-51, Juan M.E. *et al.* *J Nutr.* 2006, 136: 2553-7), anti-VIH (Zhu YM *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett.* 2001, 11: 3115-8; Kashiwada Y *et al.*, *J Nat Prod.* 1998, 61: 1090-5), vasodilatadora (Rodríguez-Rodríguez R. *et al.* *Br J Nutr.* 2004, 92: 635-42), hipoglucemiante (Sato H. *et al.* *Biochem Biophys Res Commun.* 2007, 362: 793-8, Yoshikawa M *et al.*, *Biofactors.* 2000, 13: 231-7), antiulcerosa e hipolipemiante (Ma BL. *Traditional Medicine and Pharmacology.* 1986, 2: 28-29).
- 20 La presente invención está relacionada con la búsqueda de nuevos tratamientos contra la EM y describe una nueva aplicación farmacológica del ácido oleanólico como agente capaz atenuar de forma notable los signos clínicos e inmuno-inflamatorios de la encefalomiелitis autoinmune experimental.

Descripción de la invención

Descripción breve

En la presente invención se describe la utilización de un triterpeno pentacíclico, en la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas y composiciones nutracéuticas para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, preferentemente la esclerosis múltiple. Forma parte de la invención la utilización de un compuesto de la invención en el que el triterpeno pentacíclico es el ácido oleanólico. (ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico)



Asimismo forma parte de la invención una composición farmacéutica útil para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, preferentemente esclerosis múltiple que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un triterpeno pentacíclico, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

También entran en el alcance de la invención una composición farmacéutica en la que el triterpeno pentacíclico es el ácido oleanólico así como el uso de la composición farmacéutica en el tratamiento de un ser humano afectado por una enfermedad neurodegenerativa, preferentemente por esclerosis múltiple consistente en la administración de dicha composición terapéutica que reduce la progresión de la enfermedad.

Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han logrado observar que el ácido oleanólico no sólo es un agente capaz atenuar de forma notable los signos clínicos e inmuno-inflamatorios de la encefalomiелitis autoinmune experimental inducida en ratones C57BL (hembras de 6-8 semanas de edad), modelo animal agudo de la esclerosis múltiple, sino que retrasa significativamente la manifestación de la enfermedad, más concretamente (ver Ejemplo 1):

a) Mejora del estado de la enfermedad EAE mediante administración i.p. de 6 mg/kg peso de ácido oleanólico (OA1), y

b) Retraso del inicio de la EAE mediante administración i.p. de 6 mg/kg peso de ácido oleanólico (OA2).

ES 2 326 065 B1

Dichas acciones se manifiestan a través de la i) la inhibición en la manifestación de los síntomas neurológicos, ii) ganancia de peso, iii) disminución de extravasación celular y molecular, iv) disminución de la expresión de proteínas con relevancia en procesos inflamatorios, y v) aumento de la supervivencia de los animales con EAE.

5 Por lo tanto, los resultados sugieren que este triterpeno podría tener efectos protectores en los cambios de la permeabilidad de la BHE y pro-inflamatorios relacionados con la evolución de la EAE, que podrían dar lugar a una mejora de los síntomas clínicos asociados a la EM, en el modelo de EAE, así como a otras alteraciones neurodegenerativas. Además, al ser este producto una sustancia natural que puede aislarse de la aceituna, este compuesto podría usarse como un aporte complementario de la dieta o en preparaciones nutraceuticas.

10 Así, un objeto de la presente invención lo constituye la utilización de un triterpeno pentacíclico, en adelante utilización de un compuesto de la presente invención, en la elaboración de composiciones farmacéuticas y nutraceuticas para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, preferentemente la esclerosis múltiple.

15 Tal como se utiliza en la presente invención el término triterpeno pentacíclico se refiere a un miembro de dicha familia de compuestos perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: ácido oleanólico, ácido maslínico y eritrodiol.

20 Un objeto particular de la presente invención lo constituye la utilización de un compuesto de la invención en el que el triterpeno pentacíclico es de la familia de los oleananos, preferentemente el ácido oleanólico.

25 Tal como se utiliza en la presente invención el término “la utilización de un triterpeno pentacíclico” incluye además el uso de sus formas isoméricas, sales farmacéuticamente aceptables y solvatos, derivados sintéticos como por ejemplo ciano, imidazol, amido, ester y éter derivados de los compuestos originales. Los triterpenos pentacíclico de la presente invención utilizados pueden ser isómeros, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros. El uso de sus isómeros, enantiómeros así como de diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención. Los diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

30 Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran la utilización de los profármacos de los triterpeno pentacíclico. El término “profármaco” tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado de un triterpeno pentacíclico, por ejemplo, ésteres, incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc., carbamatos, amidas, cianoderivados, etc., que, cuando se administran a un individuo es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, dicho triterpeno pentacíclico en dicho individuo.

35 Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del triterpeno pentacíclico cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del mismo en un compartimento biológico. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

40 Tal como se utiliza en la presente invención el término “enfermedades neurodegenerativas” se refiere a patologías que cursan con degeneración celular del sistema nervioso central y que presentan un componente inmuno-inflamatorio, y de forma más concreta se refiere, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, a la esclerosis múltiple y a la enfermedad de Alzheimer.

45 De acuerdo con esto, otro objeto particular de la presente invención lo constituye la utilización de un compuesto de la invención en la elaboración de composiciones farmacéuticas o nutraceuticas para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas humanas pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, a la esclerosis múltiple y la enfermedad de Alzheimer.

50 Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica útil para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un triterpeno pentacíclico, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

55 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el triterpeno pentacíclico pertenece al siguiente grupo: ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido betulínico.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el triterpeno pentacíclico pertenece al siguiente grupo: ácido oleanólico, ácido maslínico y eritrodiol.

60 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el triterpeno pentacíclico es el ácido oleanólico.

65 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye adyuvantes, sólidos o líquidos, disolventes, tensioactivos, etc.

Si se desea, dicha composición farmacéutica puede contener, además, uno o más agentes terapéuticos que, eventualmente, potencien la acción terapéutica de dicho compuesto triterpeno pentacíclico o bien que incrementen su espectro de acción.

5 El compuesto triterpeno pentacíclico estará presente en la composición farmacéutica en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, en una cantidad apropiada para ejercer su efecto terapéutico. En una realización particular, la composición farmacéutica proporcionada por esta invención, contiene entre 0,01% y 99,99% en peso de un compuesto triterpeno pentacíclico y sus mezclas, y puede presentarse en cualquier forma farmacéutica de administración apropiada en función de la vía de administración elegida, por ejemplo, oral, parenteral, intraperitoneal o tópica. Una
10 revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de sus procedimientos de preparación puede encontrarse, por ejemplo, en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, 1ª edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

15 Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en el tratamiento de un ser humano afectado por una enfermedad neurodegenerativa, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que reduce la progresión de dicha enfermedad, preferentemente la esclerosis múltiple.

Breve descripción de las figuras

20 Figura 1: Inhibición de la pérdida de peso (A) y síntomas clínicos (B) provocados durante la progresión de la enfermedad por efecto del ácido oleanólico, inyectado diariamente en el momento de la aparición de los primeros síntomas clínicos - OA1.

25 Figura 2: Inhibición de la pérdida de peso (A) y síntomas clínicos (B) provocados durante la progresión de la enfermedad por efecto del ácido oleanólico, inyectado diariamente a los 7 días de la inducción de la enfermedad - OA2.

30 Figura 3: Inhibición de la adherencia (A) y rodamiento (B) de los leucocitos por efecto del ácido oleanólico, analizados por microscopía intravital. C, animales sanos. EAE, animales enfermos. EAE+OA1, animales enfermos tratados con OA cuando aparecen los primeros síntomas de la enfermedad. EAE+OA2, animales enfermos tratados a los 7 días de la inducción de la enfermedad.

35 Figura 4: Inhibición de las alteraciones de la permeabilidad vascular en la médula espinal (A), cerebro (B) y cerebelo (C) por acción del ácido oleanólico, medido por extravasación de Azul de Evans. C, animales sanos. EAE, animales enfermos. OA, animales sanos tratados con OA. EAE+OA1, animales enfermos tratados con OA cuando aparecen los primeros síntomas de la enfermedad. EAE+OA2, animales enfermos tratados a los 7 días de la inducción de la enfermedad.

40 Figura 5: Modulación de la expresión de proteínas pro-inflamatorias en la médula espinal (A), cerebro (B) y cerebelo (C) por acción del ácido oleanólico, medido mediante kit de ELISA comercial. C, animales sanos. OA, animales sanos tratados con OA. EAE, animales enfermos. EAE+OA1, animales enfermos tratados con OA cuando aparecen los primeros síntomas de la enfermedad. EAE+OA2, animales enfermos tratados a los 7 días de la inducción de la enfermedad.

45 Figura 6: Incremento en la supervivencia de los ratones con EAE por acción del ácido oleanólico, inyectado en el momento de la aparición de los primeros síntomas clínicos.

Ejemplos de la invención

50 Ejemplo 1

El ácido oleanólico mejora los signos y síntomas de animales con EAE

55 En los ensayos se utilizaron quince animales por grupo. La EAE se indujo de la manera descrita (Slavin A. Autoimmunity 1998, 28: 109) en ratones hembra C57BL por administración de una proteína proteolipídica. La inmunización se llevó a cabo con 100 µg de un péptido parcial de glucoproteína de oligodendrocito de mielina (MOG₃₃₋₅₅) en adyuvante completo de Freund, que contiene 4 mg de Mycobacterium tuberculosis H37Ra en 1 ml. Los ratones se inmunizaron mediante una inyección subcutánea de esta emulsión en el día 0. Además, en el día 0 y 2, se administraron por vía intraperitoneal 300 ng/200 µl de toxina de Bordetella pertussis. La administración de 6 mg/kg de ácido
60 oleanólico por vía intraperitoneal se efectuó una vez al día, comenzando:

1.- a los 12 días de inducción de la EAE, cuando aparecen los primeros síntomas clínicos, y continuando hasta el día 21º después de la inducción de la EAE (OA1), y

65 2.- a los 7 días de inducción de la EAE, antes que aparezcan los primeros síntomas clínicos, y continuando hasta el día 21º después de la inducción de la EAE (OA2).

ES 2 326 065 B1

Se observó diariamente la evolución clínica de los animales (peso y síntomas) utilizando un sistema de registro y se comparó con un grupo de animales EAE al que se administró el vehículo, con animales controles sin tratar o con animales controles que reciben la misma dosis diaria de ácido oleanólico. Además, se realizó una evaluación patológica para confirmar el efecto de mejora del estado de la enfermedad.

El peso de los ratones de cada grupo se representa en las figuras 1 A y 2 A. El nivel de los síntomas de la EAE alcanzados por los ratones de cada grupo se representa en las figuras 1 B y 2 B.

Evaluación del efecto del ácido oleanólico

El efecto de mejora de la enfermedad (efecto clínico) por acción del ácido oleanólico se puntúa y se evalúa con el patrón presentado a continuación.

Puntuación 0.0: sin síntomas.

Puntuación 0.5: debilidad o flaqueza de la cola (cola 50% o 2/3).

Puntuación 1.0: parálisis total de la cola (cola 100%).

Puntuación 1.5: paresia (debilidad o flaqueza motora) de patas traseras.

Puntuación 2.0: parálisis moderada parcial 1 ó 2 pata(s) traseras (arrastra patas traseras).

Puntuación 2.5: parálisis severa parcial 1 ó 2 pata(s) traseras.

Puntuación 3.0: parálisis total de patas traseras.

Puntuación 3.5: parálisis moderada de patas delanteras.

Puntuación 4.0: parálisis total de patas delanteras y traseras.

Puntuación 5.0: muerte.

Tal como se indica en la Figura 1B, en comparación con el grupo control (sanos), el grupo EAE representa la evolución sintomática de la enfermedad. El grupo tratado con 6 mg/kg del compuesto triterpénico natural aislado del aceite de orujo, el ácido oleanólico, mostró una mejoría significativa del estado clínico de la enfermedad en comparación con el grupo EAE. Además, la severidad de la EAE fue también significativamente atenuada con la administración profiláctica del ácido oleanólico, ya que se observó un retraso en el inicio de la enfermedad (Fig. 2B). En ambas situaciones se reprimió significativamente la reducción del peso corporal, observándose un efecto de recuperación (Fig. 1A) o de prevención (Fig. 2A).

Además, como ya se ha mencionado anteriormente, en la EM se produce una infiltración de células inflamatorias en el SNC debido a que la BHE pierde su impermeabilidad originándose extravasación tanto celular como molecular. Estos fenómenos tienen lugar principalmente en las vénulas donde el flujo sanguíneo es menor. Para estudiar las interacciones leucocito-endotelio que se producen *in vivo* en la microcirculación (fundamentalmente los fenómenos de rodamiento y de adhesión leucocitaria), se recurrió a la microscopía intravital de fluorescencia. En la Figura 3 se muestran los leucocitos adheridos (A) y con rodamiento retardado (B). Los animales EAE mostraron un incremento significativo de ambos parámetros respecto a los animales controles sanos. En cambio cuando los animales pertenecían a los grupos del protocolo EAE+OA1 o del protocolo EAE+OA2, se observó una disminución significativa del flujo de leucocitos en rodamiento y adheridos al endotelio, en comparación con el grupo EAE. A continuación, para caracterizar los cambios en la permeabilidad vascular, se inyectó Azul de Evans vía intraperitoneal a los distintos grupos de animales. En la Figura 4 se observa la extravasación que se produce en la médula espinal, cerebro y cerebelo, encontrándose que los grupos de ratones del protocolo EAE+OA1 y del protocolo EAE+OA2 presentan una extravasación significativamente disminuida en los tres tejidos estudiados, en comparación con los animales EAE que no reciben tratamiento.

El análisis de la expresión de proteínas proinflamatorias relevantes en la EAE, llevó a estudiar la presencia y modulación de la osteopontina en el SNC. En la Figura 5 se observa que tanto en la médula espinal como en el cerebro y cerebelo de animales con EAE hay un incremento en la expresión de esta proteína, en comparación con los ratones controles sanos. Este incremento se vio significativamente reducido cuando a los ratones se les trató con el ácido oleanólico, tanto siguiendo el protocolo OA1 como el OA2.

En cuanto a la supervivencia (Fig. 6), se observó que en el grupo EAE al que se administra el vehículo, los ratones mueren dentro de los primeros 40 días, tras la inducción de la enfermedad. En cambio, en el grupo al que se administra el ácido oleanólico al inicio de los síntomas, los animales no murieron hasta los 60 días, post-inducción.

Material y métodos

Animales de experimentación

5 Los animales se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, en jaulas con lecho de viruta, alimentándolos con una dieta de piensos especial para animales de laboratorio, con un consumo variable en función de peso y la edad de animal, agua *ad libitum*, temperatura constante de 20-24°C y expuestos a un ciclo de luz de 12 h/día (8.00 a.m. - 8.00 p.m.) (Consejo de Comunidades Europeas, 1986). Los protocolos del estudio han sido aprobados por el comité de Ética de investigación animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de
10 Valladolid.

Reactivos utilizados

15 Los siguientes productos químicos empleados en las experiencias fueron proporcionados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA): adyuvante completo de Freíd, M. tuberculosis H37 RA, B. pertussis toxina, rodamina 6G y Azul de Evans. El kit de ELISA para la detección de la osteopontina fue de la casa comercia IBL (Hamburgo, Alemania). El compuesto natural ácido oleanólico fue suministrado por Cymit Química S.L. (Barcelona, Spain).

20 El triterpeno pentacíclico, ácido oleanólico fue inicialmente disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar una solución stock de 10^{-2} M. Las posteriores diluciones del triterpeno también se realizaron en DMSO. La concentración final de DMSO alcanzada (inferior al 0.001%) no afectó significativamente a los resultados.

Inducción de la EAE

25 La EAE se indujo en ratones hembra del linaje C57BI/6 de 6-8 semanas siguiendo el protocolo descrito por (Slavin A. Autoimmunity 1998, 28:109-20), y se caracteriza por una parálisis ascendente progresiva. Los animales recibieron una dosis subcutánea de una mezcla de 100 µg MOG₃₅₋₅₅ + adyuvante completo de Freud + 4 mg/ml M. tuberculosis H37 RA. Una inyección i.p. de 300 ng/animal de B. pertussis toxina administrada por 2 veces, con un intervalo de 48 horas. Los animales se examinaron diariamente para monitorizar la pérdida de peso y la aparición de los síntomas
30 neurológicos.

Determinación de osteopontina en el SNC

35 Los extractos proteicos del SNC se obtienen de animales de los distintos grupos de experimentación, sacrificados 21 días después de la inmunización. La médula espinal, el cerebro y el cerebelo se extraen tras realizar la microscopia intravital. Los tejidos se homogeneizan en una disolución: 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM Fenil metil sulfonil fluoruro, 0.1 mM benzetonio cloruro, 10 mM EDTA and 20 KI aprotinina (100 mg de tejido/ml). El homogenizado se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C y en los sobrenadantes se determina la concentración de osteopontina mediante un kit de ELISA comercial.
40

Microscopía intravital en el cerebro de los ratones

Las técnicas de microscopía intravital permiten el estudio de las interacciones que los leucocitos establecen con el endotelio en un segmento venular. Los leucocitos que interaccionan con la superficie endotelial pueden visualizarse directamente, ya que ven reducida su velocidad de forma marcada, con relación a la velocidad media del flujo sanguíneo en la vénula. Para realizar un estudio preciso de las interacciones leucocito-endotelio, primero se efectuó un registro de la vénula durante un minuto mediante una videocámara y, en un segundo tiempo, se efectuó el análisis detallado. Los parámetros de mayor interés fueron el número de leucocitos adheridos al endotelio (número de leucocitos inmóviles durante más de 30 segundos), el flujo de leucocitos con interacciones de rodamiento (número de leucocitos por minuto que exhiben fenómenos de rodamiento, atravesando un punto determinado de la vénula con una velocidad menor que la de los eritrocitos).
50

La craneotomía se realizó en la región parietal. Inicialmente, los animales recibieron rodamina 6G intravenosa (0.3 mg/kg peso) para marcar los leucocitos. La fluorescencia asociada a la rodamina 6G se visualizó con epi-iluminación a 510-560 nm, usando un filtro de emisión de 590 nm. Un microscopio, con objetivo 20X, se utilizó para observar los eventos micro-circulatorios en los vasos cerebrales. Una cámara de video acoplada al microscopio proyecta la imagen en un monitor y las imágenes se graban en video para un posterior análisis del número de leucocitos en rodamiento y adhesión.
55

Determinación de alteraciones en la extravasación

60 El colorante Azul de Evans es capaz de unirse cuantitativamente a la albúmina, tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta propiedad ha sido ampliamente usada para cuantificar la extravasación proteica como un índice del incremento de la permeabilidad vascular e, indirectamente, del daño tisular. El Azul de Evans, una vez extravasado hacia los tejidos, es entonces removido de los mismos, y cuantificado por espectrofotometría a visible.
65

Ratones de todos los grupos de experimentación recibieron por vía i.p. 30 mg/kg de peso de Azul de Evans. Tras sacrificar a los animales se extirpó la médula espinal, el cerebro y el cerebelo, y cada espécimen se lavó en solución

ES 2 326 065 B1

salina. El contenido de Azul de Evans de cada tejido se determinó después de su extracción con formamida (24 horas, a 60°C) utilizando espectrofotometría a 620 nm. La cantidad de Azul de Evans se expresa como $\mu\text{g AE/g}$ tejido seco.

Análisis Estadístico

5

Los datos se presentan como media \pm DS. Los resultados se analizan usando el test de Mann Whitney U-test. La diferencia entre los valores experimentales se ha considerado significativa desde $P < 0.05$.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 326 065 B1

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de un triterpeno pentacíclico en la elaboración de composiciones farmacéuticas y nutracéuticas para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, preferentemente la esclerosis múltiple.

2. Utilización según la reivindicación 1 **caracterizada** porque el triterpeno pentacíclico pertenece al siguiente grupo: ácido oleanólico, ácido maslínico y eritrodiol.

10 3. Utilización según la reivindicación 1 **caracterizada** porque el triterpeno pentacíclico es el ácido oleanólico (ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico).

15 4. Composición farmacéutica útil para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa **caracterizada** por que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un triterpeno pentacíclico, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4 **caracterizada** por que el triterpeno pentacíclico pertenece al siguiente grupo: ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido betulínico.

20 6. Composición farmacéutica según la reivindicación 4 **caracterizada** porque el triterpeno pentacíclico pertenece a la familia de los oleananos, preferentemente el ácido oleanólico, ácido maslínico y eritrodiol.

25

30

35

40

45

50

55

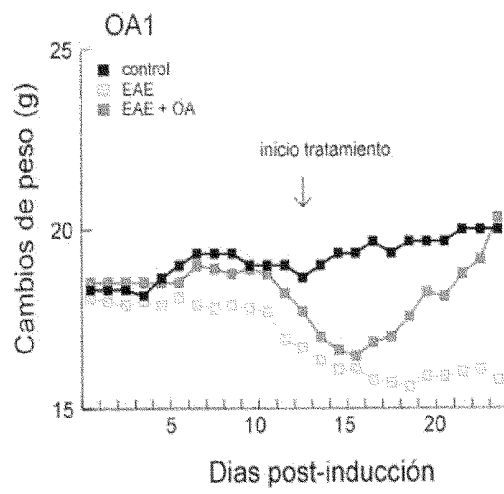
60

65

Figura 1

A

Peso



B

Sintomas

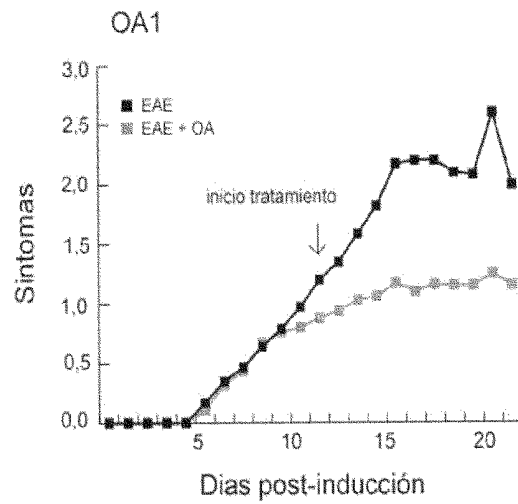
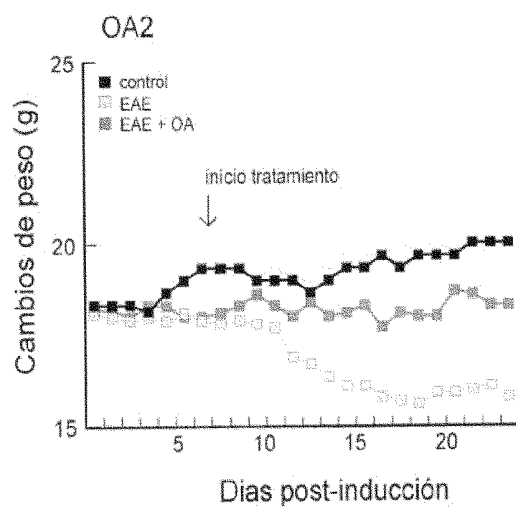


Figura 2

A

Peso



B

Sintomas

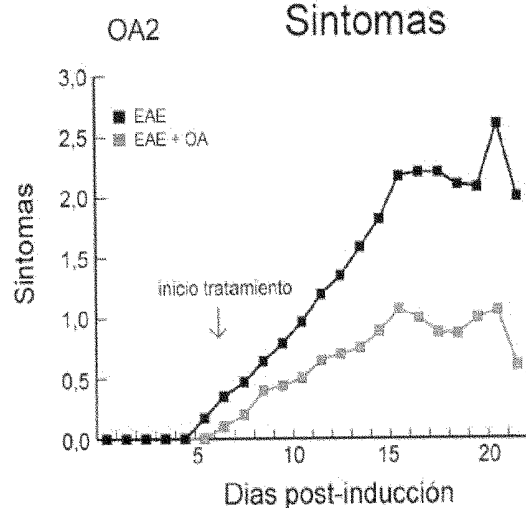


Figura 3

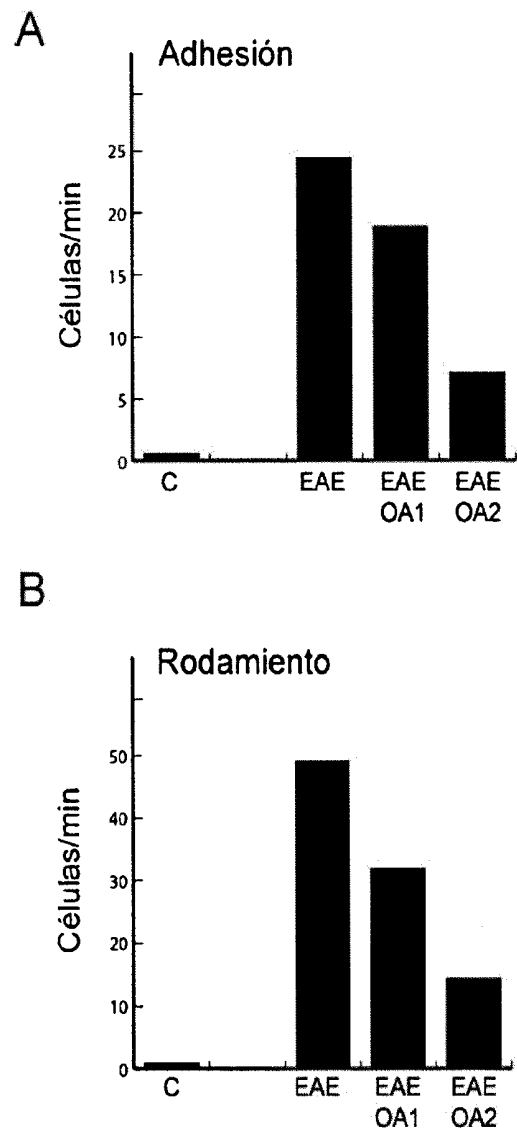


Figura 4

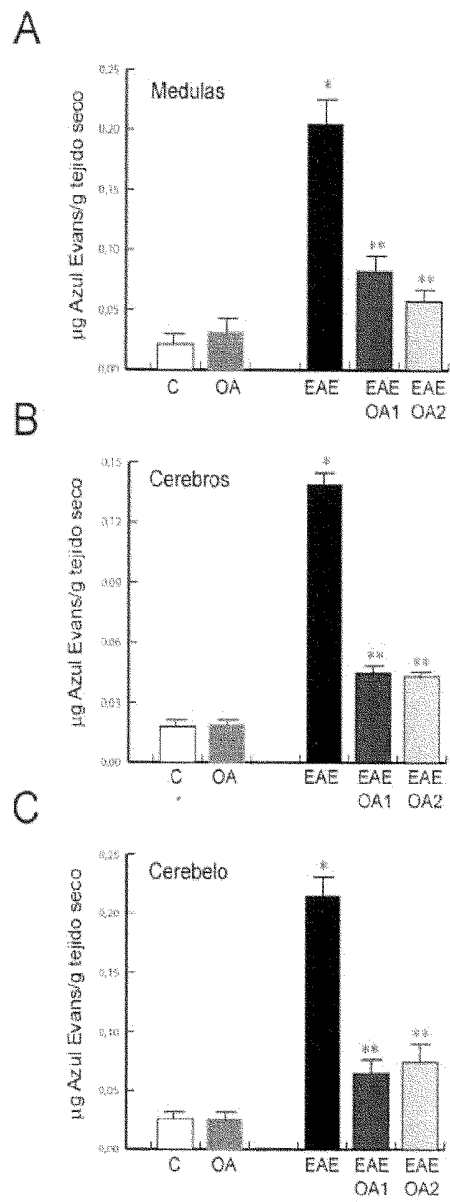


Figura 5

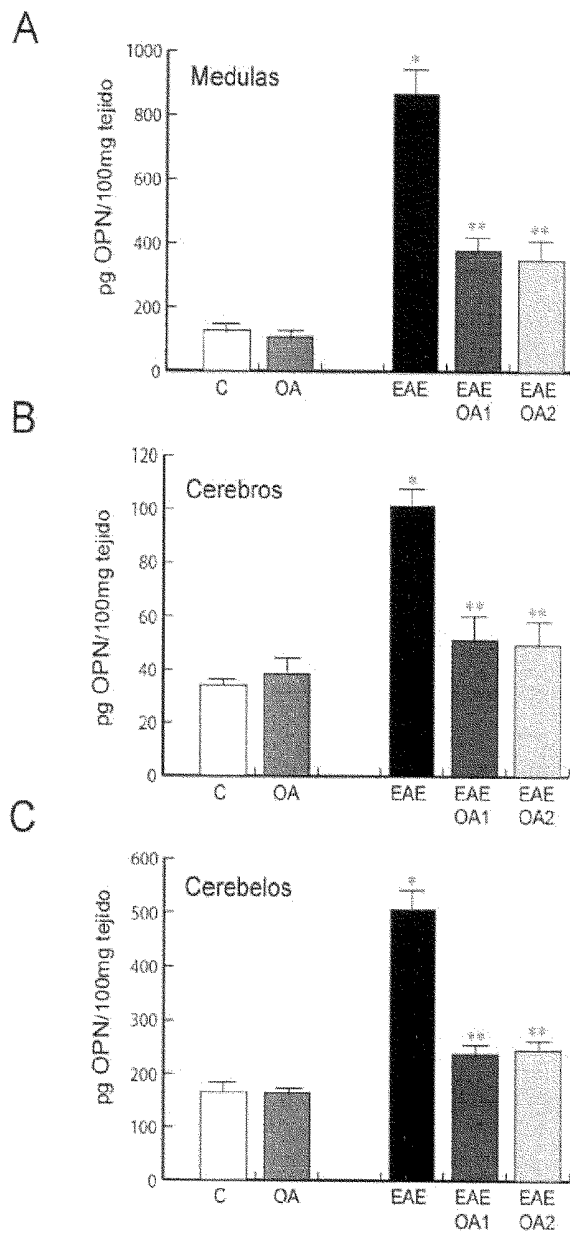
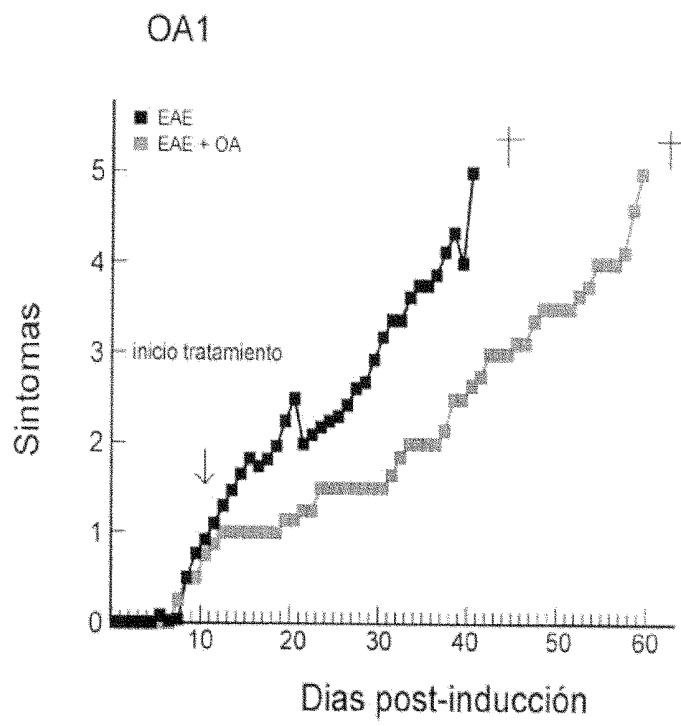


Figura 6





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 326 065

② Nº de solicitud: 200800873

③ Fecha de presentación de la solicitud: **28.03.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 31/56** (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9965478 A1 (TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE) 23.12.1999, páginas 2,3; reivindicaciones.	1,4
X	MAIA, J. L. et al.: "Oleanolic acid, a pentacyclic triterpene attenuates capsaicin-induced nociception in mice: Possible mechanisms" Pharmacological Research, 2006, vol. 54, páginas 282-286, página 283, apartado 2.4.	4-6
A	OVESNA, Z. et al.: "Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds" Neoplasma, 2004, vol. 51, (5) páginas 327-333, todo el documento.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

04.08.2009

Examinador

H. Aylagas Cancio

Página

1/1