

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/118441 A1

(43) Fecha de publicación internacional
1 de octubre de 2009 (01.10.2009)

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 31/56 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

La Grasa (IG), Avda. Padre García Tejero, 4, 41012 Sevilla (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/070024

(74) Mandatario: PONS ARIÑO, Ángel; Glorieta Rubén Darío, 4, 28010 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:
12 de febrero de 2009 (12.02.2009)

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200800873 28 de marzo de 2008 (28.03.2008) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): NIETO CALLEJO, Maria Luisa [ES/ES]; Instituto De Biología y Genética Molecular (IBGM), Sanz y Flores, s/n, E-47003 Valladolid (ES). MARTÍN MONTAÑA, Rubén [ES/ES]; Instituto De Biología y Genética Molecular (IBGM), Sanz y Flores, s/n, E-47003 Valladolid (ES). CARVALHO TAVARES, Juliana [BR/ES]; Instituto De Biología y Genética Molecular (IBGM), Sanz y Flores, s/n, E-47003 Valladolid (ES). RUIZ GUTIÉRREZ, Valentina [ES/ES]; Instituto De

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: USE OF PENTACYCLIC TRITERPENE FOR THE PREPARATION OF A PHARMACEUTICAL COMPOUND INTENDED FOR THE TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS

(54) Título: UTILIZACIÓN DE UN TRITERPENO PENTACÍCLICO PARA LA PREPARACIÓN DE UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DESTINADA AL TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

(57) Abstract: The invention relates to the use of pentacyclic triterpene for the preparation of a pharmaceutical compound intended for the treatment of multiple sclerosis. Oleanolic acid (3 β -hydroxyolean-12-en-28-oic acid) is a pentacyclic triterpene acid present in a large number of medicinal plants. The invention relates to the pharmacological use of oleanolic acid either alone or combined with other substances in the therapy or prophylaxis of neurodegenerative diseases, such as multiple sclerosis. The applicants have found that the daily intraperitoneal administration of oleanolic acid significantly reduces the neurological and immunoinflammatory symptoms associated with experimental autoimmune encephalomyelitis, an experimental model of multiple sclerosis, delaying the onset and reducing the progression of the disease.

(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 inmunoinflamatorios asociados a la encefalomiélitis autoinmune experimental, un modelo experimental de la esclerosis múltiple, retardando el inicio y reduciendo el progreso de la enfermedad.

WO 2009/118441 A1

UTILIZACIÓN DE UN TRITERPENO PENTACÍCLICO PARA LA PREPARACIÓN DE UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DESTINADA AL TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

5

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 medula 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

5 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.

15

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 LM. et al Neuropathol Appl Neurobiol. 1998, 24: 320-30). En función de la especie y/o cepa animal y el

30

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 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 lejjas residuales procedentes del aderezo de las aceitunas. Se encuentra además en aceitunas maduras, aceite de
10 oliva virgen y aceite de orujo.

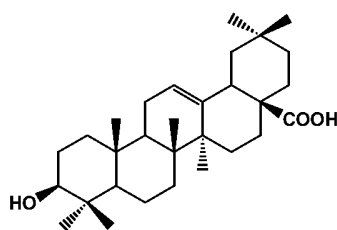
 Son numerosas las publicaciones sobre las propiedades terapéuticas de los compuestos triterpénicos y en particular sobre el ácido oleanólico hay múltiples estudios que recogen sus actividades biológicas y farmacológicas. Entre ellas
15 destacan: actividad hepatoprotectora (Liu Y et al., Toxicology Letters 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.
20 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).

25 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)



Ácido oleanólico

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).

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.

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 nutracéuticas.

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 nutracéuticas para

la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, preferentemente la esclerosis múltiple.

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 máslínico y eritrodíol.

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.

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.

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. 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
5 cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

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,
10 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.

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
15 composiciones farmacéuticas o nutracéuticas 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.

Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición
20 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
25 aceptables.

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 maslinico y eritrodiol.

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.

5 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.

10

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.

15

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 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.

20

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

25

30

de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que reduce la progresión de dicha enfermedad, preferentemente la esclerosis múltiple.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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.

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.

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.

Figura 4: Inhibición de las alteraciones de la permeabilidad vascular en la medula 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.

Figura 5: Modulación de la expresión de proteínas pro-inflamatorias en la medula 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.

5

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.

10 EJEMPLOS DE LA INVENCION

Ejemplo1.- El ácido oleanólico mejora los signos y síntomas de animales con EAE.

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 proteolípida. 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 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

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).

30

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.

5 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 figura 1 A y 2 A. El nivel de los síntomas de la EAE alcanzados por los ratones de cada grupo se

10 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.

15

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.

20 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.

25 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

30 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 medula 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 medula 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

15 Animales de experimentación

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 Valladolid.

25 Reactivos utilizados

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).

5 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.

10 **Inducción de la EAE**

La EAE se indujo en ratones hembra del linaje C57Bl/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 μ g MOG₃₅₋₅₅ + adyuvante completo de 15 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 neurológicos.

20 **Determinación de osteopontina en el SNC**

Los extractos proteicos del SNC se obtienen de animales de los distintos grupos de experimentación, sacrificados 21 días después de la inmunización. La medula 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% 25 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.

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).

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 vídeo 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.

Determinación de alteraciones en la extravasación

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.

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 medula espinal, el cerebro y el cerebelo, y cada espécimen se lavó en solución 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.

10

Análisis Estadístico

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 $P < 0.05$.

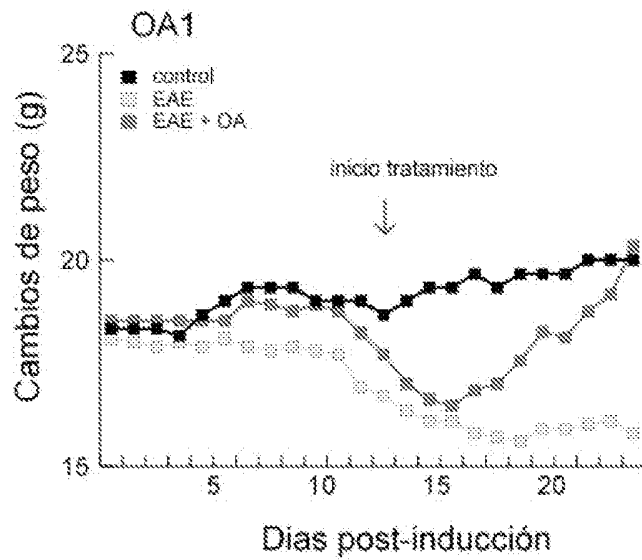
15

REIVINDICACIONES

- 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.
- 5
- 2.- Utilización según la reivindicación 1 caracterizada porque el triterpeno pentacíclico pertenece al siguiente grupo: ácido oleanólico, ácido maslinico 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).
- 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.
- 15
- 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
- 7.- Uso de la composición farmacéutica según las reivindicaciones 4 a la 6 en el tratamiento de un ser humano, afectado por una enfermedad neurodegenerativa, preferentemente la esclerosis múltiple, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que reduce la progresión de dicha enfermedad.
- 30

A

Peso



B

Sintomas

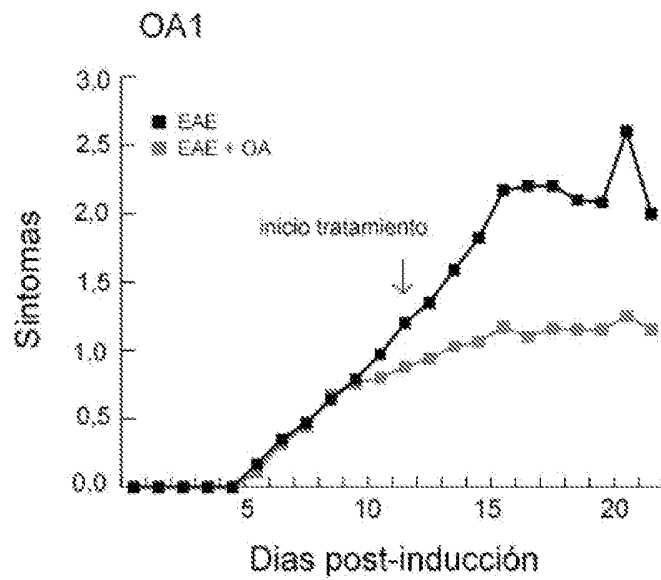
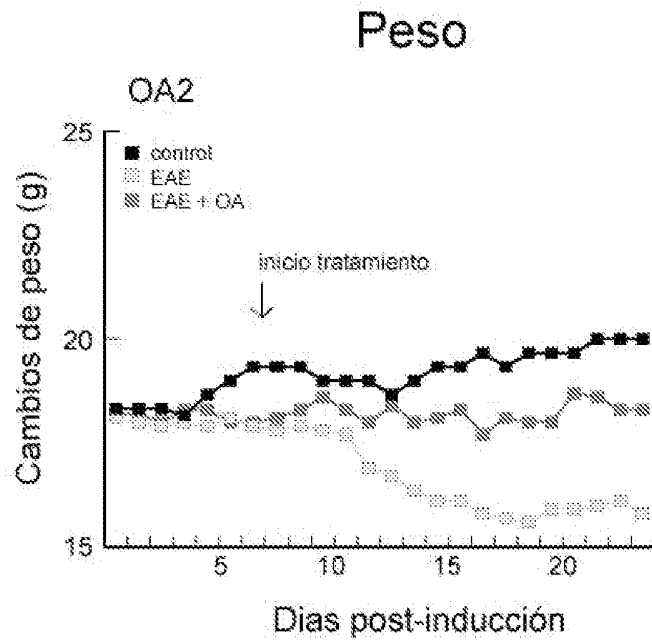


FIG 1

A



B

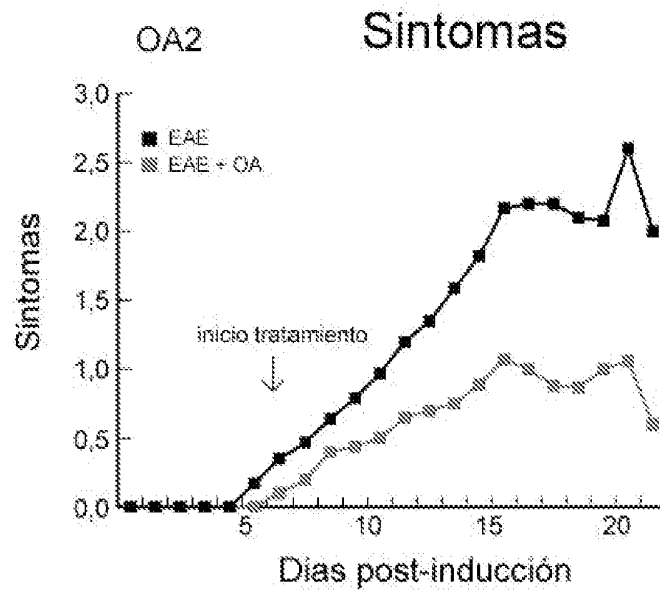


FIG 2

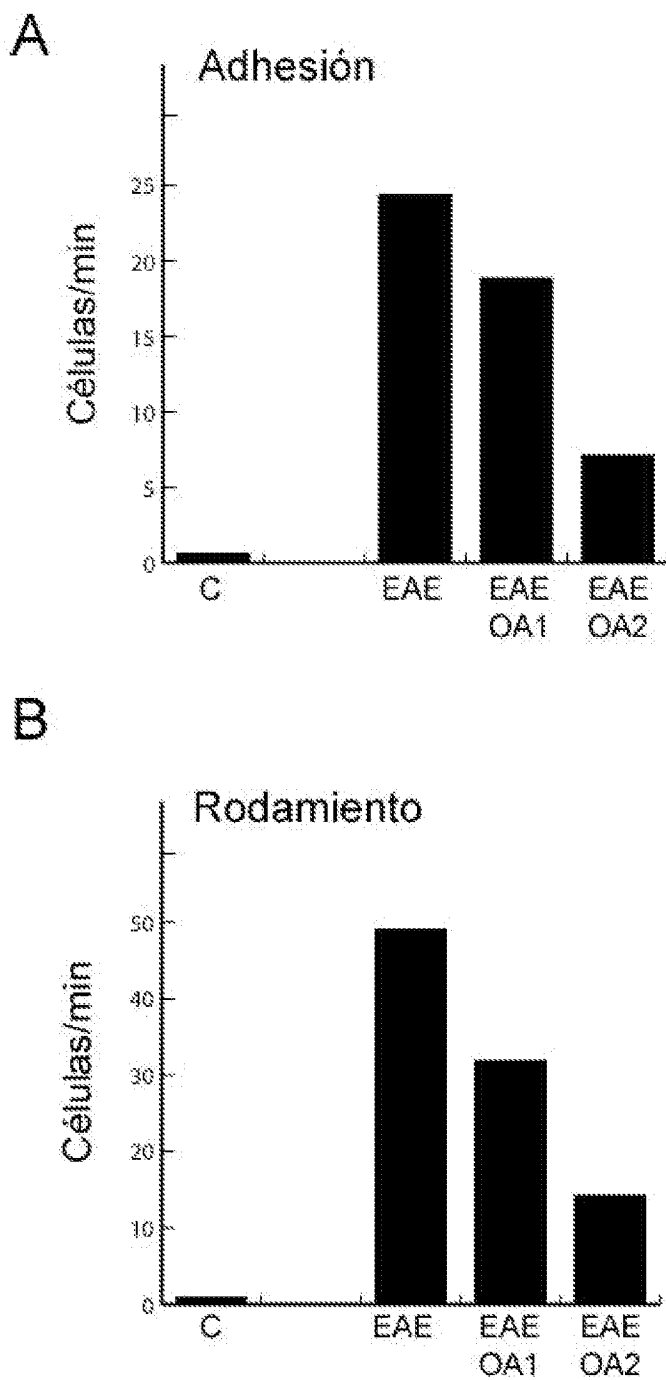


FIG 3

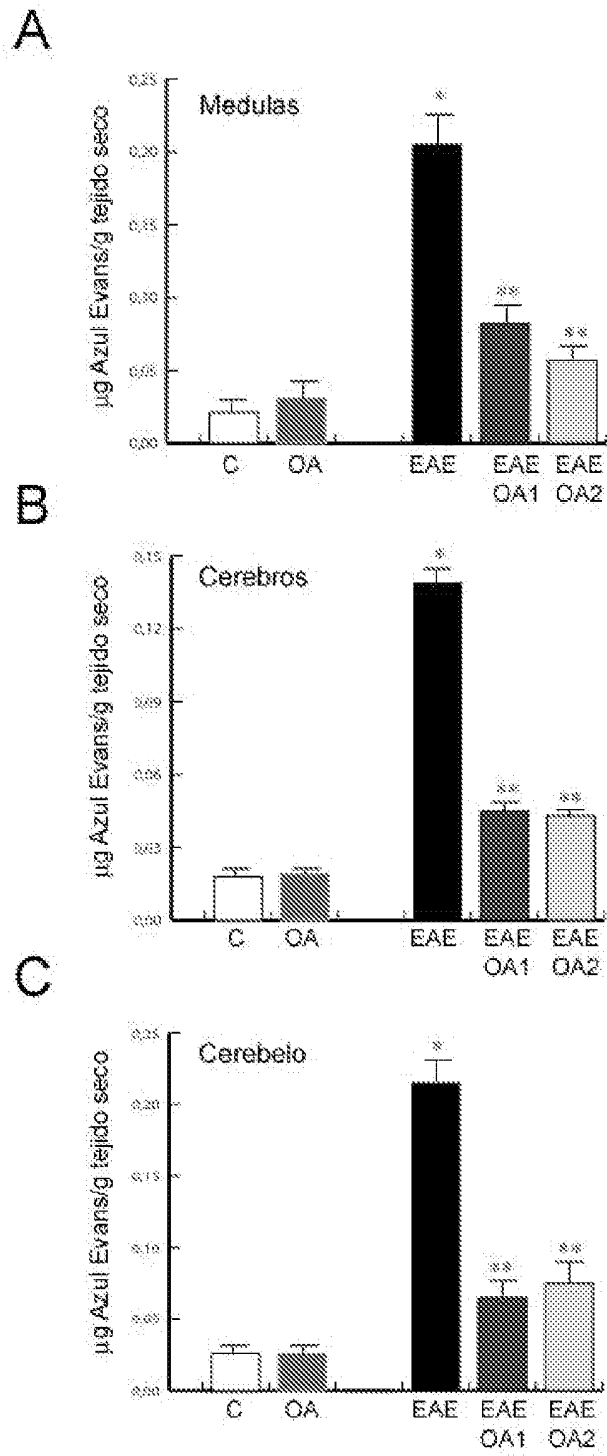


FIG 4

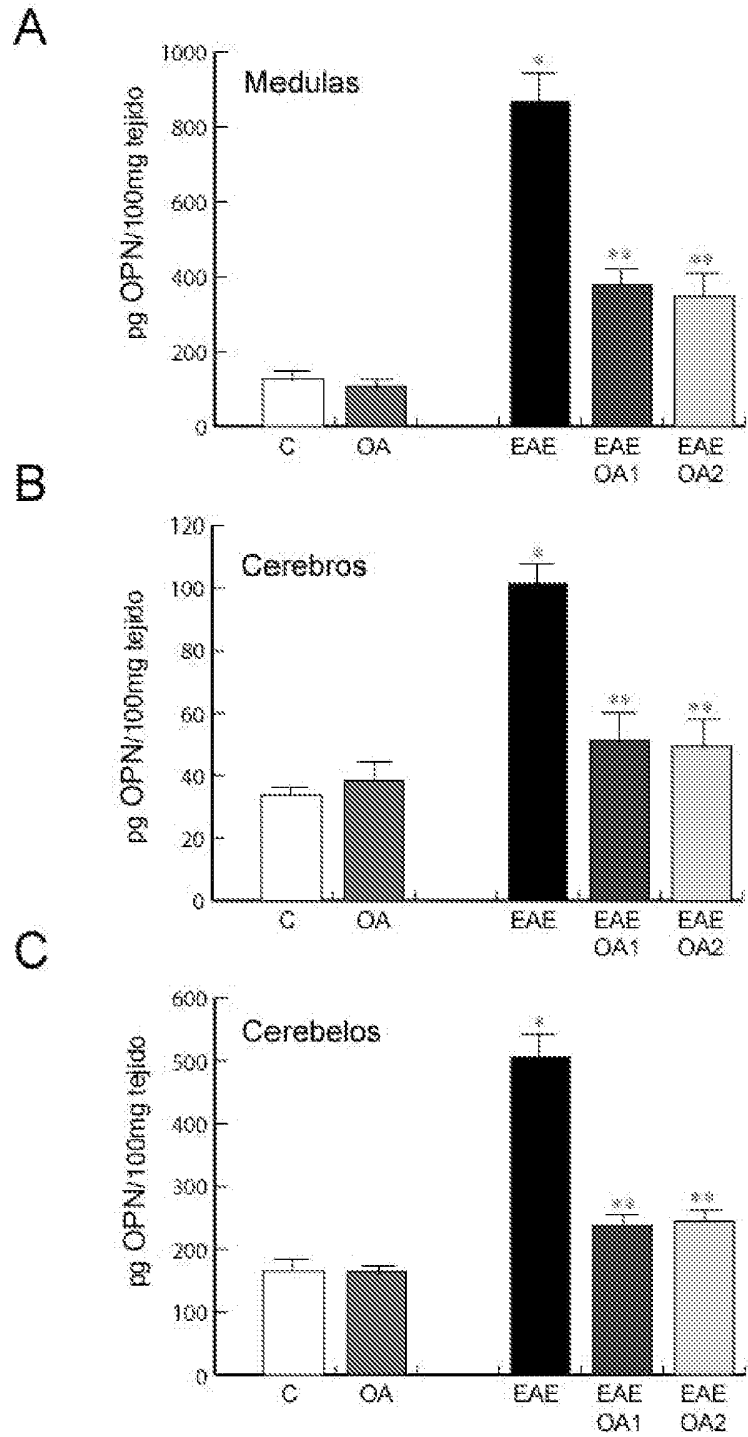


FIG 5

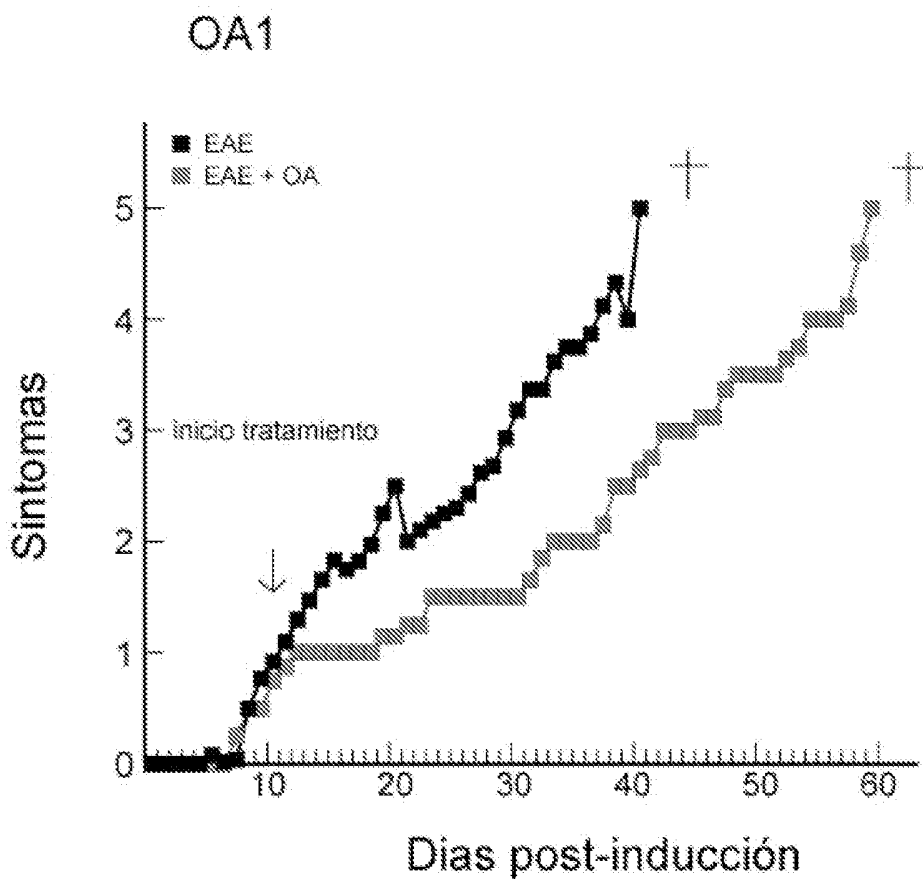


FIG 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 2009/070024

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, HCAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9965478 A1 (TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE) 23.12.1999, pages 2, 3, claims.	1, 4, 7.
X	MAIA, J. L. ET AL.: "Oleanolic acid, a pentacyclic triterpene attenuates capsaicin-induced nociception in mice: Possible mechanisms" Pharmacological Research, 2006, vol. 54, pages 282-286, page 283, paragraph 2.4.	4-6.
A	OVESNA, Z. ET AL.: "Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds" Neoplasma, 2004, vol. 51, (5) pages 327-333, the whole document.	1-7.

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:		later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	"T"	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"I"	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 June 2009 (10.06.2009)

Date of mailing of the international search report

(16/06/2009)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

H. Aylagas Cancio

Telephone No. +34 91 349 8563

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070024

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 7 relates to a method for treatment of the human or animal body by therapy.
The search has been carried out on the basis of the possible effects of the composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/070024

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9965478 A	23.12.1999	CA 2335505 A	23.12.1999
		EP 1089724 AB	11.04.2001
		US 6326507 B	04.12.2001
		US 2002042535 A	11.04.2002
		US 6552075 B	22.04.2003
		JP 2002530272 T	17.09.2002
		US 2003236303 A	25.12.2003
		US 7288568 B	30.10.2007
		US 2005288363 A	29.12.2005
		US 2008234368 A	25.09.2008
		US 2008220057 A	11.09.2008
		AT 430563 T	15.05.2009
		EP 2062577 A	27.05.2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/070024

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/56 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ES 2009/070024

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, HCAPLUS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	WO 9965478 A1 (TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE) 23.12.1999, páginas 2, 3, reivindicaciones.	1, 4, 7.
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.	1-7.

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

10 Junio 2009 (10.06.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

16 de Junio de 2009 (16/06/2009)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado
H. Aylagas Cancio

N° de teléfono +34 91 349 8563

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070024

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones N°s: 7
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
se refieren a un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal. La búsqueda se ha realizado considerando los posibles efectos de la composición.
2. Las reivindicaciones N°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070024

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 9965478 A	23.12.1999	CA 2335505 A	23.12.1999
		EP 1089724 AB	11.04.2001
		US 6326507 B	04.12.2001
		US 2002042535 A	11.04.2002
		US 6552075 B	22.04.2003
		JP 2002530272 T	17.09.2002
		US 2003236303 A	25.12.2003
		US 7288568 B	30.10.2007
		US 2005288363 A	29.12.2005
		US 2008234368 A	25.09.2008
		US 2008220057 A	11.09.2008
		AT 430563 T	15.05.2009
		EP 2062577 A	27.05.2009

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070024

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 31/56 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)