

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 333 638**

21 Número de solicitud: 200901745

51 Int. Cl.:

**A61K 31/56** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **29.07.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **24.02.2010**

Fecha de la concesión: **07.10.2010**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:  
**18.05.2010**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **21.10.2010**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**21.10.2010**

73 Titular/es: **Universidad de Granada  
Hospital Real - Cuesta del Hospicio, s/n  
18071 Granada, ES**

72 Inventor/es: **Nieto López, Francisco Rafael;  
Baeyens Cabrera, José Manuel;  
García-Granados López de Hierro, Andrés;  
Entrena Fernández, José Manuel;  
Cobos del Moral, Enrique José;  
Martínez Rodríguez, Antonio;  
Parra Sánchez, Andrés y  
Rivas Sánchez, Francisco**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Uso del ácido maslínico para el tratamiento de dolores de naturaleza nociceptiva, inflamatoria y neurogénica.**

57 Resumen:

Uso del ácido maslínico para el tratamiento de dolores de naturaleza nociceptiva, inflamatoria y neurogénica. La presente invención se refiere al uso del ácido maslínico y cualquiera de sus derivados para el tratamiento de procesos patológicos dolorosos, de naturaleza (1) nociceptiva, (2) inflamatoria o (3) neurogénica, por cualquier medio galénicamente aceptable y muy especialmente por vía tópica, incluyendo composiciones que contengan ácido maslínico, cualquiera de sus derivados, o mezclas naturales, sintéticas o semisintéticas ricas en maslínico o sus derivados.

ES 2 333 638 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

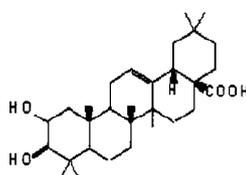
Uso del ácido maslínico para el tratamiento de dolores de naturaleza nociceptiva, inflamatoria y neurogénica.

5 La presente invención se refiere al uso del ácido maslínico y cualquiera de sus derivados para el tratamiento de procesos patológicos dolorosos, de naturaleza (1) nociceptiva, (2) inflamatoria o (3) neurogénica, por cualquier medio galénicamente aceptable y muy especialmente por vía tópica, incluyendo composiciones que contengan ácido maslínico, cualquiera de sus derivados, o mezclas naturales, sintéticas o semisintéticas ricas en maslínico o sus derivados.

10 **Estado de la técnica**

El ácido oleanólico (3-beta-hidroxi-28-carboxiolean-12-eno) es un ácido triterpénico ubicuamente repartido en el reino vegetal. Así, la base de datos fitoquímica del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos recoge su presencia en casi un centenar de plantas, entre las que se encuentra la *Olea europaea*, así como una serie de actividades biológicas comprobadas (antiabortivo, anticariogénico, antifertilidad, antihepatotóxico, antiinflamatorio, antisarcómico, preventivo del cáncer, cardiotónico, diurético, hepatoprotector y uterotónico). Existen algunas referencias que demuestran la eficacia del ácido oleanólico en modelos experimentales de dolor nociceptivo somático y visceral en ratón [Maia *et al.*, *Pharmacol Res.* (2006) 54: 282-286; Maia *et al.*, *Biol Pharm Bull.* (2006) 29:82-5]. Igualmente, los resultados obtenidos en un ensayo clínico piloto [Lukaczer *et al.*, *Phytother Res.* (2005) 19: 864-869], también sugieren cierta eficacia del ácido oleanólico en la reducción del dolor en pacientes con artritis, aunque en este caso el ácido oleanólico fue administrado en comprimidos, en combinación con un extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) e iso-alfa ácidos reducidos procedentes del lúpulo (*Humulus lupulus*). En dichos comprimidos se desconoce la proporción de cada uno de los componentes, incluido el ácido oleanólico.

25 El ácido maslínico (2-alfa,3-beta-dihidroxi-28-carboxiolean-12-eno), también denominado ácido crataególico, es un ácido mucho menos repartido en la naturaleza, habiendo sido detectado en una decena de plantas. Se conoce su actividad como antihistamínico y anticanceroso, aunque su escasez hace que no se haya estudiado extensamente. El aislamiento de los ácidos oleanólico y maslínico de las ceras de la superficie del fruto de la *Olea europaea*, ha sido descrito [Bianchi, G., Pozzi, N. And Vlahov, G. *Phytochemistry* (1994) 37, 205-207] mediante la extracción metanólica de olivas previamente lavadas con cloroformo. La separación de este tipo de ácidos ha sido descrita mediante cromatografía en contracorriente de alta velocidad (HSCCC) [Du, Q.Z., Xiong, X.P. and Ito, Y.; *Journal of Liquid Chromatography* (1995) 18. 1997-2004].



45 **Acido maslínico**

La Universidad de Granada, en su solicitud de patente ES2111498 describe un procedimiento de aprovechamiento industrial de los ácidos oleanólico y maslínico contenidos en los subproductos de la molturación de la aceituna. Este procedimiento permite obtener un material adecuado para multitud de aplicaciones.

55 Existe en la actualidad, un gran número de patentes en las que el ácido maslínico actúa como componente activo: agente antitumoral US2003153538 o WO0252956; inductor de apoptosis WO03057224; alimento anorético WO203039270 y WO03011267; agente externo para la piel y blanqueador US2003133958; tratamiento de lesiones vasculares WO02078685.

En algunas publicaciones se sugiere que este triterpeno puede tener también una actividad antiinflamatoria y antioxidante al inhibir la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF $\alpha$  y la producción de NO y del peróxido de hidrógeno (ROS) en macrófagos peritoneales estimulados con LPS [Marquez-Martín *et al.*, *Free Radic. Res.* (2006) 40: 295-302]. Sin embargo, los mismos autores no encuentran un efecto claro del ácido maslínico sobre la producción de citoquinas pro-inflamatorias en células mononucleares de sangre periférica humana [Marquez-Martín *et al.*, *Cytokine* (2006) 36: 11-17]. En todo caso, lo que estas discrepancias ponen de manifiesto es que las respuestas no son homogéneas y por tanto no son predecibles, lo que hace necesario el estudio en cada modelo y/o tipo de tejido.

65 No aparecen referencias bibliográficas que relacionen el ácido maslínico con tratamientos de dolor.

Actualmente el tratamiento del dolor es de gran importancia en medicina ya que es necesario el hallazgo de nuevas terapias más eficaces y/o mejor toleradas que las actualmente disponibles para combatirlo. Esto se pone de manifiesto en el gran número de trabajos científicos en investigación básica y clínica sobre nuevas estrategias para el tratamiento del dolor que en los últimos años han ido apareciendo.

Entre las distintas definiciones de dolor, la más aceptada es la que propone la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (International Association for the Study of Pain, IASP) que define al dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable con daño tisular real o potencial o descrito en términos de dicho daño”. A pesar de que el dolor es siempre subjetivo, es posible clasificarlo. Los principales subtipos de dolor sobre los que versa esta invención son: (1) dolor nociceptivo (es decir, dolor causado por activación directa de los nociceptores [2008 *IASP Pain Terminology*, <http://www.iasp-pain.org>]), (2) dolor inflamatorio (es decir, dolor causado por lesión tisular con inflamación [Woolf, *Br. J. Anaesth.* 75: 169-176, 1995]) y (3) dolor neurogénico (es decir, dolor causado por una lesión primaria, disfunción o alteración transitoria en el sistema nervioso periférico o central [1994 *IASP Pain Terminology*, <http://www.iasp-pain.org>]).

El dolor (1) de tipo nociceptivo suele responder bien al tratamiento con analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y con analgésicos opiáceos, según la escalera de la OMS [Krakowski *et al.*, *Br. J. Cancer* (2003) 89, S67-S72]. No obstante, ambos tipos de fármacos producen con frecuencia efectos secundarios. Por ejemplo, los AINEs pueden producir alteraciones y lesiones gastrointestinales, reducción de la función renal con retención de agua, sodio y potasio y reacciones de hipersensibilidad entre otras. Los analgésicos opiáceos producen con frecuencia náuseas y vómitos, estreñimiento, depresión respiratoria, así como tolerancia y dependencia entre otros efectos secundarios.

El dolor (2) de tipo inflamatorio responde a tratamientos con AINEs, aunque como se ha comentado anteriormente estos fármacos producen con frecuencia efectos secundarios [Munir *et al.*, *Med Clin North Am* (2007)91: 97-111]. Así mismo, los antiinflamatorios esteroideos, también denominados corticosteroides, son eficaces para el tratamiento de la inflamación [Stephens *et al.*, *Am. Fam. Physician* (2008) 78: 971-976], pero pueden provocar la supresión de la secreción endógena de esteroideos, úlcera peptídica, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión, diabetes, osteoporosis y glaucoma entre otros efectos secundarios.

El dolor neurogénico (3) responde a la administración de algunos antiepilépticos (como gabapentina, pregabalina o carbamazepina) y de antidepresivos tricíclicos (como amitriptilina) [Jackson, *Pain Pract.* (2006) 6: 27-33], pero más de una tercera parte de los pacientes no responden a ningún tratamiento, por lo que son necesarios nuevos fármacos eficaces para su tratamiento.

### Explicación de la invención

La presente invención describe el uso del ácido maslínico o cualquiera de sus derivados para el tratamiento sintomático de cualquier clase de dolor clínicamente adscribible a tipo (1) nociceptivo, y/o tipo (2) inflamatorio y/o tipo (3) neurogénico.

En esta invención, se demuestra la eficacia del tratamiento incluso por administración tópica. Es muy importante destacar este hecho puesto que permite localizar de una forma rápida y eficaz altas concentraciones del producto activo o sus sales biológicamente aceptables, por lo que se logra un efecto rápido sobre el dolor experimentado.

En la presente invención, y como consecuencia de los resultados obtenidos, mostrados en la sección de ejemplos, se demuestra que:

La administración subcutánea de ácido maslínico inhibe el dolor inducido por estímulos de tipo químico en el ratón, en este caso, la segunda fase del dolor en el test de la formalina al 5%, en la que se produce un fenómeno de inflamación localizada en la pata inyectada con formalina (ver apartado 6.1 y tabla 1 en la sección de ejemplos).

La administración tópica cutánea del ácido maslínico también inhibió el dolor inflamatorio de la segunda fase del test de la formalina. El efecto analgésico se debió a una acción local pues la aplicación del maslínico en una pata no produjo analgesia en la pata contralateral (ver apartado 6.2 y tabla 2 en la sección de ejemplos).

La administración subcutánea de ácido maslínico también fue eficaz en un modelo de dolor neurogénico inducido por la administración de capsaicina [Baumann *et al.*, *J. Neurophysiol.* (1991) 66: 212-227]. En este modelo el ácido maslínico inhibió la alodinia mecánica a un estímulo puntiforme inducida por la administración intraplantar de capsaicina en el ratón (ver apartado 6.3 y tabla 3 en la sección de ejemplos). Puesto que este es un modelo de dolor neurogénico causado por sensibilización central [Iannetti *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2005)102: 18195-18200] estos datos indican que el maslínico es capaz de actuar en el sistema nervioso central para ejercer sus efectos.

Es interesante destacar que la administración del inhibidor de la COX-2 rofecoxib no fue capaz de inhibir el dolor neurogénico (hipersensibilidad mecánica) inducida por la capsaicina (ver apartado 6.7 y tabla 7 en la sección de ejemplos). Puesto que según se demuestra en los ejemplos (apartado 6.3), el ácido maslínico sí es capaz de hacerlo, el efecto analgésico del ácido maslínico tiene que ser debido a un mecanismo diferente al de la inhibición de la COX-2.

## ES 2 333 638 B2

El ácido maslínico administrado subcutáneamente en el ratón también consiguió inhibir el dolor nociceptivo somático inducido por un estímulo cutáneo térmico (modelo de la placa caliente a 50°C) y el dolor nociceptivo visceral, inducido por la administración intraperitoneal de ácido acético al 0,6% en el ratón (ver apartados 6.4 y 6.5, y tablas 4 y 5 en la sección de ejemplos).

El ácido maslínico (administrado por vía subcutánea a la dosis más alta evaluada en los modelos de dolor) no tuvo ningún efecto secundario apreciable al observar el comportamiento espontáneo del animal y tampoco alteró la coordinación motora de los animales cuando estos fueron sometidos al test del Rotarod (ver apartado 6.6 y tabla 6 en la sección de ejemplos). Esto indica que la acción antinociceptiva y antialodínica del ácido maslínico no se debe a una inhibición inespecífica del sistema nervioso central.

Preferentemente se utiliza un principio activo natural en la que el ácido maslínico está acompañado de cantidades menores de ácido oleanólico, todo ello en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En todo caso, el ácido maslínico, o cualquiera de sus derivados, o la combinación de éstos o la combinación de éstos con ácido oleoico, constituye más del 66% del este principio activo natural y preferentemente más del 85% del mismo.

En caso de incluir ácido oleanólico en la mezcla de principios activos, la relación entre el ácido maslínico y el ácido oleanólico es de entre 2:1 y 7:1.

Es decir, el ácido maslínico, sus sales, derivados farmacéuticamente aceptables o sus profármacos, se formularán en una composición farmacéutica apropiada, en la cantidad terapéuticamente efectiva, junto con uno o más vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Concretamente, para la administración tópica el ácido maslínico, sus derivados, o la mezcla de ácido maslínico y ácido oleanólico antes descrita como principio activo, se encuentra en una proporción de entre 0,5% y 10% del total de la composición, preferentemente entre el 0,5% y el 5% y aún más preferentemente entre el 1% y el 3%.

En cualquiera de los casos, se utilizará, preferentemente, ácido maslínico o alguno de sus derivados, procedentes de subproductos industriales de plantas del género *Olea*.

Esta composición, se puede administrar de distintas formas, entre ellas, pero sin limitarse a éstas, oralmente, bucalmente, rectalmente, intramuscularmente, de forma tópica, de forma subcutánea, intraarticularmente o por inhalación.

Preferiblemente se administra de forma tópica, oral, subcutánea o mediante infiltraciones articulares. En otra realización preferida, dicha composición se presenta en una forma adaptada a la administración tópica.

En cada caso la composición se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, la composición descrita anteriormente se puede presentar bajo la forma de tabletas, grageas, cápsulas, soluciones, emulsiones, cremas, leche corporal, ungüentos, inhalantes, aerosoles, supositorios o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente eficaz. Más preferiblemente en forma de solución, emulsión, crema, leche corporal o ungüento.

Por un derivado farmacéuticamente aceptable se entiende cualquier sal, farmacéuticamente aceptable o cualquier otro compuesto que, después de su administración, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el ácido maslínico.

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 sólidos o líquidos, disolventes, tensioactivos, etc.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y tablas se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto, entre otros aspectos, la actividad y eficacia del ácido maslínico y demuestran lo que de forma general se ha descrito en los apartados anteriores.

De forma genérica para todos los ejemplos, se describen los animales de experimentación, compuestos, materiales y métodos utilizados y resultados obtenidos:

#### 1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones hembra de la cepa CD-1 (Charles River España, Barcelona) de 25-30 g de peso, con al menos 8 animales en cada grupo experimental. Los animales fueron alojados en cajas de makrolón y se mantuvieron en una

## ES 2 333 638 B2

habitación a  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  de temperatura ambiente, con cambio de aire cada 20 minutos y con un ritmo de luz-oscuridad de 12 horas (luz desde las 8 a las 20 horas). Los animales dispusieron de comida y agua “*ad libitum*” hasta el momento del experimento. Los animales fueron manejados de acuerdo con la directiva comunitaria de 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC).

### 2. *Compuestos, fármacos y soluciones*

Los compuestos químicos que se emplearon fueron las sustancias algógenas capsaicina, formalina (formaldehído al 38%) y ácido acético, y los fármacos ácido maslínico (en su forma de sal sódica), rofecoxib, baclofeno y gabapentina.

Para el tratamiento sistémico se utilizaron tres tipos de solvente: a) dimetilsulfóxido (DMSO), en el que se disolvió la capsaicina; b) suero salino estéril, que se utilizó para diluir las soluciones de capsaicina en DMSO (hasta obtener una concentración de  $1 \mu\text{g}$  de capsaicina en DMSO al 1%), de formalina (hasta obtener una concentración de 5%) y de ácido acético (hasta una concentración de 0,6%); así como para disolver el rofecoxib, el baclofeno y la gabapentina; y c) una solución de tween 80 al 2% en agua ultrapura, en la que se disolvió el ácido maslínico en su forma de sal sódica.

Para la evaluación del efecto local del ácido maslínico, se utilizó un tratamiento tópico por formación de la sal del ácido maslínico con trietanolamina en propilenglicol, que fue vehiculizada en un gel carbopol alcanzando una proporción final de ácido maslínico del 1%. Las experiencias también se realizaron en animales controles tratados con el hidrogel base de propilenglicol, trietanolamina y carbopol (sin ácido maslínico).

La solución madre de capsaicina en DMSO puro se preparaba a una concentración de 5 mg/ml la cual se fraccionaba y congelaba (durante un máximo de 5 días) a  $-20^\circ\text{C}$  en alícuotas. Cada día de experimento la alícuota correspondiente se descongelaba y se diluía en salino a la concentración de  $0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La solución de formalina se preparaba el mismo día del experimento y se diluía a la concentración del 5% en suero salino. Igualmente la solución de ácido acético se preparaba el mismo día del experimento, diluyendo el ácido acético a la concentración de 0,6% en suero salino.

La solución de ácido maslínico se preparaba diariamente antes del comienzo de los experimentos a la concentración necesaria para administrar la dosis estudiada, disolviéndolo en una solución de tween 80 al 2% en agua ultrapura. El baclofeno, el rofecoxib y la gabapentina se administraron y prepararon siguiendo el mismo procedimiento, pero en este caso el solvente fue suero salino.

### 3. *Material e instrumentos*

Para la administración de los fármacos por vía subcutánea se utilizaron jeringuillas de insulina. Para la administración intraperitoneal del ácido acético se usaron las mismas jeringuillas, pero provistas de una aguja de  $30^{1/2}$  G. Para la inyección intraplantar de capsaicina se utilizó una jeringa Hamilton de  $100 \mu\text{l}$  modelo 1710 TLL provista de una aguja de  $30^{1/2}$  G. Para la aplicación tópica del ácido maslínico en hidrogel y el hidrogel base en la pata trasera del animal, se utilizó una espátula de aluminio.

Para la medición de la respuesta de lamido inducida por la formalina se utilizaron: cronómetros digitales con una precisión de 0,01 segundos, vasos de precipitado de vidrio transparente de 1 litro con un diámetro de 12 cm y 14 cm de alto en los que se introducía el animal para observar su comportamiento y espejos de 20 x 20 cm colocados detrás del vaso para facilitar la visión de la pata inyectada.

Para la medición de las contorsiones inducidas por la solución de ácido acético, se usaron cajas de makrolón, con el suelo cubierto de virutas de madera. Igualmente se usaron espejos de 20 x 20 cm colocados detrás de la caja de makrolon para facilitar la visión de las contorsiones.

Para la valoración de la alodinia mecánica inducida por capsaicina, se utilizó un aparato denominado Dynamic Plantar Aesthesiometer modelo 37400 (Ugo Basile, Italia). El aparato consta de un habitáculo para mantener a los animales durante el estudio y de una unidad electrónica que permite la estimulación de la pata del animal mediante un filamento (controlando electrónicamente la fuerza aplicada y la velocidad con la que se aplica) y el registro de los datos (tiempo de latencia desde la aplicación del estímulo hasta la retirada de la pata).

Para la realización del test de la placa caliente se utilizó una placa caliente comercial (Letica, España) rodeada de paredes de metacrilato transparentes de 16 cm de altura y conectada a un baño de agua termostatzada (JP Selecta, España). Se usó una sonda para medición de temperatura de superficie conectada a un termómetro electrónico (Fisher Bioblock Scientific, España) para comprobar que la temperatura de la superficie de la placa era la adecuada.

Para comprobar si el ácido maslínico produce alteraciones en la coordinación motora, se utilizó un aparato denominado Accelerating Rotarod (Cibertec, Madrid, España). El aparato consta de un cilindro giratorio dividido en 5 compartimentos, separados por paredes de plástico opacas, en donde se sitúan los ratones. El aparato dispone de un motor que permite aplicar una aceleración constante (desde 4 a 40 rpm en 5 minutos) y cronometrar automáticamente el tiempo que tarda en caer del cilindro cada ratón.

#### 4. Procedimientos experimentales

##### 4.1. Administración de los fármacos y soluciones

5 Para la inyección intraplantar se utilizó el procedimiento descrito previamente [Cendán *et al.*, *Psychopharmacology (Berl.)* (2005) 182: 485-493]: se introdujo la aguja de la jeringa Hamilton en la pata trasera derecha del animal, desde la parte posterior de la planta en dirección a los dedos, se inyectaron los 20  $\mu$ l de solución de capsaicina o de formalina (o sus solventes respectivos) en un tiempo de aproximadamente 5 segundos y se extrajo lentamente la aguja, con la precaución de presionar sobre el lugar por donde penetró la aguja para que no se perdiera líquido. La solución de ácido acético se inyectó por vía intraperitoneal en un volumen de 10 ml/kg del modo descrito previamente [Del Pozo *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* (1987)137: 155-160].

15 Para valorar el efecto sistémico de los fármacos en estudio, éstos se administraron por vía subcutánea en el área interescapular, en un volumen de 5 ml/kg siguiendo procedimientos estándares [Del Pozo *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* (1987) 137: 155-160]. Los animales de los grupos control recibieron por la misma vía de administración el mismo volumen de los solventes (tween 80 al 2% en agua para el maslínico o suero salino para el rofecoxib, el baclofeno y la gabapentina).

20 Para la aplicación cutánea del hidrogel con ácido maslínico al 1% o su solvente (hidrogel base) se extendía una cantidad de 0.1 ml de hidrogel por toda la pata trasera, desde el tobillo hasta los dedos, siguiendo el procedimiento experimental previamente descrito [Li *et al.*, *Anesthesiology* (2007) 107: 486-494]. Dependiendo del objetivo del experimento el hidrogel se aplicó en la pata trasera derecha, que posteriormente iba a ser inyectada con formalina (pata ipsilateral) o, en otro grupo experimental, en la pata trasera izquierda (pata-contralateral), es decir en la pata no tratada con formalina. En este caso se trataba de comprobar que el efecto del ácido maslínico al aplicarlo de forma tópica es local y no sistémico.

##### 4.2. Modelo de la formalina

30 Se utilizó el procedimiento previamente descrito [Cendán *et al.*, *Psychopharmacology (Berl.)* (2005) 182: 485-493]. Los animales permanecieron al menos 30 min en la habitación donde se realizó el experimento, antes de iniciarse éste. Pasado el tiempo de habituación a la sala, recibieron una inyección de ácido maslínico (o su solvente) por vía s.c. y se les devolvió a las cajas de makrolón. En los experimentos en los que se aplicó el hidrogel de ácido maslínico o su solvente, cada animal se colocó directamente en un vaso de precipitado, para evitar que las virutas se pegaran en la pata untada con el hidrogel. A los 30 minutos de la administración s.c. del ácido maslínico o su solvente (solución de tween 80 al 2% en salino) y a los 15 minutos de la aplicación tópica ipsilateral de ácido maslínico (administrado en forma de hidrogel) o su solvente (hidrogel base), los animales recibieron en la pata trasera derecha una inyección intraplantar de formalina. Para comprobar, que el efecto del hidrogel del ácido maslínico es local, también se llevaron a cabo experimentos en los que el hidrogel se aplicaba en la pata contralateral (pata izquierda) a la inyectada con formalina.

40 Inmediatamente después de la inyección de la formalina, cada ratón se colocó bajo un vaso de precipitado de 1 litro invertido, y el tiempo que los animales se lamían/mordisqueaban la pata inyectada se evaluó durante 50 min (divididos en 10 periodos de 5 min cada uno). Tal y como había sido previamente descrito [Cendán *et al.*, *Psychopharmacology (Berl.)* (2005) 182: 485-493] el tiempo de lamido/mordisqueo observado durante el periodo de 0-5 min tras la inyección de formalina fue considerado indicativo de la primera fase de dolor, mientras que el tiempo de lamido/mordisqueo observado entre los 10 y los 50 min posteriores a la inyección fue considerado indicativo de la segunda fase del dolor.

##### 4.3. Modelo de alodinia mecánica inducida por capsaicina

50 El procedimiento experimental utilizado fue el descrito previamente [Entrena *et al.*, *Pain* (2009) 143:252-261]. Para evitar que las conductas exploratorias del ratón interfiriesen en los resultados obtenidos, se colocó a cada animal en el compartimiento correspondiente del aparato 2 horas antes de administrar los fármacos (tiempo de habituación). Seguidamente cada animal fue sacado de su compartimiento, recibió el producto en estudio por vía s.c. en el área interescapular e inmediatamente después fue devuelto a su compartimiento. El ácido maslínico o su solvente fueron administrados 30 minutos antes de la inyección intraplantar de capsaicina. Transcurridos 15 minutos desde la inyección de capsaicina o su solvente (tiempo en el que se consigue la máxima sensibilización por capsaicina) cada ratón fue expuesto a un estímulo mecánico de 0.5 g mediante un filamento rígido de 0,5 mm de diámetro. El tiempo transcurrido desde el estímulo de la pata hasta que el animal la retiraba fue registrado automáticamente por el aparato. El tiempo máximo de exposición al estímulo mecánico fue de 50 segundos en cada una de las determinaciones. Se realizaron en cada animal 3 medidas de la latencia de retirada de la pata, dejando un intervalo mínimo de 5 segundos entre cada una de las medidas. La media de las tres medidas fue considerada la latencia de respuesta del animal.

##### 4.4. Modelo de las contorsiones inducidas por ácido acético

65 Para su realización se utilizó un método previamente descrito [Del Pozo *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* (1987) 137: 155-160]. Los animales permanecieron al menos 30 min en la habitación donde se realizó el experimento, antes de iniciarse éste. Pasado este tiempo recibieron una inyección de ácido maslínico (o su solvente) por vía s.c. y se les devolvió a las cajas de makrolón. A los 30 minutos de la administración del ácido maslínico los animales recibieron una inyección

## ES 2 333 638 B2

intraperitoneal de ácido acético al 0,6%. Inmediatamente después de la inyección del acético, cada ratón se colocó en otra caja de makrolón más pequeña con el suelo cubierto de virutas de madera, y se evaluó el número de contorsiones que el animal realizaba durante 30 min (divididos en 6 periodos de 5 min cada uno). Se consideró que el ratón hacía una contorsión, cuando al arquear el cuerpo estiraba al menos una de las patas traseras completamente.

### 4.5. Modelo de la placa caliente

La metodología experimental utilizada fue descrita previamente [Del Pozo *et al.*, *Gen. Pharmacol.* (1990) 21: 681-685]. El termostato del baño de agua fue ajustado, para que la temperatura de la superficie de la placa fuese de 50°C. Los animales permanecieron al menos 30 min en la habitación donde se realizó el experimento, antes de iniciarse éste. Pasado este tiempo recibieron una inyección de ácido maslínico (o su solvente) por vía s.c. y se les devolvió a las cajas de makrolón. A los 30 minutos de la administración del fármaco o su solvente los animales se colocaron en la placa a esta temperatura y mediante un cronómetro se midió el tiempo que tardaban en lamerse alguna de las patas traseras, lo que llamamos tiempo de latencia de lamido de la pata trasera (LPT). Se impuso un tiempo de corte de 60 segundos para evitar daños al animal.

### 4.6. Modelo del Rotarod

La metodología utilizada fue descrita previamente [Nieto *et al.*, *Pain* (2008) 137: 520-531]. Los animales permanecieron al menos 30 min en la habitación donde se realizó el experimento, antes de iniciarse éste. El protocolo experimental consta de dos fases que se realizan en dos días consecutivos: el primer día, se lleva a cabo la *fase de aprendizaje*, ya que es necesario que los animales aprendan a mantenerse encima del cilindro y a correr en una determinada dirección. Por ello, el primer día, los animales, se colocan encima del cilindro que gira a una velocidad progresivamente creciente con una aceleración constante de 4-40 rpm en 5 min y se cronometra el tiempo que tardan en caerse del cilindro. Este procedimiento se repite 3 veces dejando un intervalo de tiempo de 30 minutos entre cada una. Con esto se consigue, que los animales se acostumbren al aparato y alcancen una latencia media de caída de unos 200 segundos. Después, los animales son devueltos a las cajas de makrolon.

Al día siguiente, se lleva a cabo la fase de evaluación: en primer lugar se comprueba que los animales siguen teniendo una latencia media de 200 seg, cuando son sometidos a una aceleración constante de 4-40 rpm en 5 minutos. Seguidamente reciben una inyección s.c. de ácido maslínico, baclofeno, gabapentina o sus solventes y se les devuelve a las cajas de makrolón; 30 minutos después se vuelven a colocar encima del cilindro para someterlos a la misma aceleración, y se comprueba su latencia de caída. Este mismo procedimiento se repitió a los 60, 90, 120 y 180 minutos tras la administración subcutánea. El tiempo de corte fue de 300 segundos, lo cual ocurre justo cuando el cilindro alcanza la aceleración máxima de 40 rpm.

## 5. Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas de las medias de los valores obtenidos en los distintos grupos de tratamiento o de los porcentajes de analgesia, se realizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía o de dos vías seguido de un test de Bonferroni. En los casos en que solo había dos grupos, las comparaciones estadísticas se hicieron mediante el test de la t de Student para datos no apareados. Todas las comparaciones se realizaron usando el programa SigmaStat versión 2.03 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA). En todos los casos se consideró que existían diferencias significativas cuando el valor de P fue menor de 0,05.

Para el cálculo del porcentaje de analgesia en los modelos de alodinia mecánica inducida por capsaicina y de placa caliente se empleó la siguiente fórmula: % Analgesia =  $[(TLC - TLT) / (TLC - TLT_{max})] \times 100$ ; donde TLT es el tiempo de latencia de los ratones tratados con ácido maslínico, TLC es el tiempo de latencia de los ratones pertenecientes al grupo control (tratados con solvente) y TC es el tiempo de corte (tiempo de latencia máximo: 50 seg para el modelo de alodinia y 60 seg para el modelo de placa caliente). Para el cálculo del porcentaje de analgesia en el modelo de formalina se empleó la siguiente fórmula: % Analgesia =  $[(TLC - TLT) / TLC] \times 100$ ; donde TLT es el tiempo de lamido de los ratones tratados con ácido maslínico, y TLC es el tiempo de lamido de los ratones pertenecientes al grupo control (tratados con solvente). Para el cálculo del porcentaje de analgesia en el modelo de contorsiones por ácido acético se empleó la siguiente fórmula: % Analgesia =  $[(NCC - NCT) / NCC] \times 100$ ; donde NCT es el número de contorsiones de los ratones tratados con ácido maslínico, y NCC es el número de contorsiones de los ratones pertenecientes al grupo control (tratados con solvente).

## 6. Resultados

## 6.1. Efecto de la administración sistémica del ácido maslínico en el test de la formalina

5 El ácido maslínico (64-512 mg/kg), administrado por vía subcutánea, no produjo cambios estadísticamente significativos en la primera fase (0-5 min) del dolor inducido por la formalina (datos no mostrados), pero fue capaz de reducir el dolor de la segunda fase (10-50 min) (Tabla 1). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas con las dosis de ácido maslínico 256 y 512 mg/kg con respecto al grupo control (Tabla 1).

TABLA 1

Efecto de la administración subcutánea de ácido maslínico, en la segunda fase del dolor inducido por formalina

<i>Tratamiento</i>	<i>Dosis (mg/kg; s.c.)</i>	<i>Tiempo de lamido (segundos)<sup>a</sup></i>	<i>Porcentaje de analgesia<sup>b</sup></i>
Solvente	-	273,73±29,03	0±10,49
Ac. Maslínico	64	196,38±34,13	29,03±12,34
	128	175,85±31,93	36,46±11,54
	256	108,85±24,63**	60,70± 8,90***
	512	145,73±14,90*	47,34± 5,38*

Efecto de la administración subcutánea de distintas dosis de ácido maslínico (64, 128, 256 y 512 mg/kg) y su solvente (Tween80 al 2% en agua ultrapura), en la segunda fase del dolor inducido por la inyección intraplantar (i. pl.) de formalina (5%). La inyección de formalina fue realizada 30 min después de la administración del ácido maslínico o su solvente. Cada valor representa la media ± ESM de los valores obtenidos en al menos 12 animales. Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con ácido maslínico y su solvente: \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001 (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

<sup>a</sup>Tiempo de lamido/mordisqueo acumulado en la segunda fase (10-50 min) del dolor tras la administración (i. pl.) de formalina al 5% (ver sección materiales y métodos para explicación en detalle).

<sup>b</sup>Porcentaje de analgesia calculado mediante la fórmula: % Analgesia = [(TLC - TLT)/TLC] x 100; donde TLT es el tiempo de lamido de los ratones tratados con ácido maslínico, y TLC es el tiempo de lamido de los ratones pertenecientes al grupo control (tratados con solvente).

## 6.2. Efecto de la administración local del ácido maslínico en el test de la formalina

El ácido maslínico al 1% en hidrogel aplicado directamente en la pata 15 minutos antes de la inyección i.pl. de formalina no modificó la primera fase (0-5 min) de la respuesta dolorosa inducida por la capsaicina (datos no mostrados); en cambio, fue capaz de inhibir la segunda fase del dolor inducido por la formalina (tabla 2). En esta segunda fase, se encontraron diferencias estadísticamente significativas, con respecto al grupo control (Tabla 2). Por el contrario cuando el ácido maslínico al 1% en hidrogel se aplicó en la pata contralateral a la que sería inyectada con formalina no tuvo ningún efecto en el dolor inducido por el irritante (tabla 2).

Estos datos indican que el ácido maslínico aplicado localmente consigue suficiente concentración en la pata ipsilateral como para inhibir la respuesta a la formalina, pero no se absorbe en grado suficiente como para ejercer efectos sistémicos (y por tanto un efecto analgésico en la pata contralateral).

TABLA 2

*Efecto de la administración tópica del ácido maslínico al 1% en forma de hidrogel, en la segunda fase del dolor inducido formalina*

<i>Pata tratada</i>	<i>Tratamiento tópico</i>	<i>Tiempo de lamido (segundos)<sup>a</sup></i>	<i>Porcentaje de analgesia<sup>b</sup></i>
Ipsilateral	Hidrogel-Control	282,27±43,18	0±15,30
	Hidrogel-AM 1%	149,13±17,16 <sup>**,#</sup>	47,17± 6,26 <sup>**,#</sup>
Contralateral	Hidrogel-Control	246,55±30,14	0±12,23
	Hidrogel-AM 1%	250,30±20,73	-1,52± 8,41

Efecto de la administración tópica, ipsilateral y contralateral, del ácido maslínico al 1% en forma de hidrogel (AM-1%) o el hidrogel base sin ácido maslínico (Control), en la segunda fase del dolor inducido por la inyección intraplantar (i. pl.) de formalina (5%). La inyección de formalina fue realizada 15 min después de la aplicación tópica cutánea del ácido maslínico o su solvente en la misma pata inyectada con formalina (ipsilateral) o en la pata no inyectada (contralateral). Cada valor representa la media ± ESM de los valores obtenidos en al menos 12 animales. Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con ácido maslínico ipsilateral y el grupo tratado con ácido maslínico contralateral: \*\* P < 0.01; diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con ácido maslínico ipsilateral y el grupo tratado con el hidrogel base ipsilateral: # P < 0.01 ## P < 0.01 (ANOVA de doble vía seguido del test de Bonferroni)

<sup>a</sup>Tiempo de lamido/mordisqueo acumulado en la segunda fase (10-50 min) del dolor tras la administración (i. pl.) de formalina al 5% (ver sección materiales y métodos para explicación en detalle).

<sup>b</sup>Porcentaje de analgesia calculado mediante la fórmula: % Analgesia = [(TLC - TLT)/TLC] x 100; donde TLT es el tiempo de lamido de los ratones tratados con ácido maslínico, y TLC es el tiempo de lamido de los ratones pertenecientes al grupo control (tratados con solvente).

## 6.3 Efecto de la administración sistémica del ácido maslínico en la alodinia mecánica inducida por capsaicina

La administración subcutánea del ácido maslínico fue capaz de inhibir la alodinia mecánica a un estímulo puntiforme inducida por capsaicina (Tabla 3). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las latencias de retirada de la pata del grupo control y las obtenidas en los grupos tratados con ácido maslínico a las dosis de 64, 256 y 512 mg/kg.

TABLA 3

Efecto de la administración subcutánea de ácido maslínico, en la alodinia mecánica inducida por capsaicina

Tratamiento	Dosis (mg/kg; s.c.)	Tiempo de latencia (segundos) <sup>a</sup>	Porcentaje de analgesia <sup>b</sup>
Solvente	-	16,68±2,21	0,58±4,41
Ac. Maslínico	64	28,56±3,67*	36,04±7,33***
	128	27,08±3,02	31,62±6,05*
	256	34,26±3,91***	53,05±7,82***
	512	36,18±4,00***	58,76±8,00***

Efecto antialodínico de la administración subcutánea (s.c.) de distintas dosis de ácido maslínico (64, 128, 256 y 512 mg/kg) y su solvente, en la alodinia mecánica inducida por la inyección intraplantar de capsaicina (1 µg). La inyección de capsaicina fue realizada 30 min después de la aplicación subcutánea del ácido maslínico o su solvente. Cada valor representa la media ± ESM de los valores obtenidos en al menos 8 animales. Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con ácido maslínico y su solvente: \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

<sup>a</sup>Tiempo de latencia de retirada de la pata trasera sensibilizada con capsaicina tras la estimulación ipsilateral con un estímulo puntiforme (0,5 mm de diámetro) aplicado con una fuerza de 0,5 gramos (ver la sección materiales y métodos para una explicación en detalle).

<sup>b</sup>Porcentaje de analgesia calculado mediante la fórmula: % Analgesia =  $[(TLT - TLC/TC) - TLC] \times 100$ ; donde TLT es el tiempo de latencia de los ratones tratados con ácido maslínico, TLC es el tiempo de latencia de los ratones pertenecientes al grupo control (tratados con solvente) y TC es el tiempo de corte (50 s).

## ES 2 333 638 B2

### 6.4 Efecto de la administración sistémica del ácido maslínico en el test de las contorsiones inducidas por ácido acético

La administración subcutánea de ácido maslínico fue capaz de reducir el número de contorsiones inducidas por la administración intraperitoneal de ácido acético al 0,6% (Tabla 4). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas, con respecto al grupo control, en el número de contorsiones que mostraron los grupos de animales tratados con todas las dosis de maslínico que se usaron (64, 128 y 256 mg/kg).

TABLA 4

Efecto de la administración subcutánea del ácido maslínico en el test de las contorsiones inducidas por ácido acético

<i>Tratamiento</i>	<i>Dosis (mg/kg; s.c.)</i>	<i>Número de contorsiones<sup>a</sup></i>	<i>Porcentaje de analgesia<sup>b</sup></i>
Solvente	-	50,17±4,84	0,00± 9,66
Ac. Maslínico	64	24,67±5,34**	50,83±10,64**
	128	30,08±4,71*	40,04± 9,38*
	256	19,58±4,14***	60,97± 8,25***

Efecto de la administración subcutánea de distintas dosis de ácido maslínico (64, 128, 256 mg/kg) y su solvente, en el dolor inducido por la inyección intraperitoneal (i.p.) de ácido acético (0,6%). La inyección de ácido acético fue realizada 30 min después de la administración del ácido maslínico o su solvente. Cada valor representa la media ± ESM de los valores obtenidos en 12 animales por grupo. Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con ácido maslínico y su solvente: \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001 (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

<sup>a</sup>Número de contorsiones acumuladas (0-30 min) tras la administración (i.p.) de acético (ver sección materiales y métodos para explicación en detalle).

<sup>b</sup>Porcentaje de analgesia calculado mediante la fórmula: % Analgesia = [(NCC - NCT)/NCC] x 100; donde NCT es el número de contorsiones de los ratones tratados con ácido maslínico, y NCC es el número de contorsiones de los ratones pertenecientes al grupo control (tratados con solvente).

## 6.5 Efecto de la administración sistémica del ácido maslínico en el test de la placa caliente a 50°C

La administración subcutánea de ácido maslínico fue capaz de aumentar el tiempo de latencia de lamido de cualquiera de las patas traseras, cuando el animal fue colocado en la placa caliente a 50°C (Tabla 5). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control en los tiempos de lamido obtenidos en los grupos tratados con las dosis de 128, 256 y 512 mg/kg de ácido maslínico (Tabla 5).

TABLA 5

*Efecto de la administración subcutánea de ácido maslínico en el test de la placa caliente*

<i>Tratamiento</i>	<i>Dosis (mg/kg; s.c.)</i>	<i>Tiempo de latencia (segundos)<sup>a</sup></i>	<i>Porcentaje de analgesia<sup>b</sup></i>
Solvente	-	13,68±0,79	0,0±1,72
Ac. Maslínico	64	16,12±1,01	5,28±2,19
	128	25,40±2,89 <sup>***</sup>	25,30±6,25 <sup>***</sup>
	256	23,80±2,69 <sup>***</sup>	21,85±5,81 <sup>***</sup>
	512	20,30±1,29	14,29±2,79

Efecto de la administración subcutánea de distintas dosis de ácido maslínico (64, 128, 256 y 512 mg/kg) o su solvente, en el tiempo de latencia de lamido de pata trasera en el test de la placa caliente a 50°C. Cada valor representa la media ± ESM de los valores obtenidos en al menos 8 animales. Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con ácido maslínico y su solvente: <sup>\*\*\*</sup> P < 0.01 (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

<sup>a</sup>Tiempo de latencia de lamido de cualquiera de las patas traseras cuando el animal es colocado en la placa a 50°C (ver materiales y métodos para una explicación más detallada).

<sup>b</sup>Porcentaje de analgesia calculado mediante la fórmula: % Analgesia = [TLT - TLC/TC - TLC] x 100; donde TLT es el tiempo de latencia de los ratones tratados con ácido maslínico, TLC es el tiempo de latencia de los ratones pertenecientes al grupo control (tratados con solvente) y TC es el tiempo de corte (60 s).

## 6.6 Efecto del ácido maslínico en el test del Rotarod

La dosis más alta de ácido maslínico que se usó por vía sistémica en los experimentos en los que se evaluaba su efecto analgésico o antialodínico (512 mg/kg; s.c.) no tuvo ningún efecto en la coordinación motora cuando los animales fueron sometidos al test del Rotarod (Tabla 6). Por el contrario los fármacos controles que se usaron, gabapentina (60 mg/kg, s.c.) y baclofeno (8 mg/kg, s.c.), si alteraron claramente la coordinación motora de los animales (Tabla 6), lo que concuerda con los datos previamente descritos en la literatura con ambos controles [Hong-Ju *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett* (2004) 14:2537-2541; Patel *et al.*, *Pain* (2001) 90: 217-226].

TABLA 6

*Comprobación de la ausencia de efectos secundarios de la administración del ácido maslínico en el modelo del rotarod (comparación con baclofeno y gabapentina)*

Tratamiento	Tiempo de latencia de rotarod (seg)					
	Tiempo desde la inyección subcutánea (min)					
	0	30	60	90	120	180
TW-80	203±34	218±32	211±22	225±26	194±23	199±23
Sal	187±22	202±26	193±22	206±19	195±20	173±25

## ES 2 333 638 B2

AM-512	200±24	210±34	204±31	204±32	208±35	184±35
Bac-8	181±25	99±18 <sup>*,##</sup>	59±13 <sup>*,##</sup>	83±14 <sup>*,##</sup>	106±21 <sup>*,##</sup>	146±26
Gab-60	175±31	138±10	102±19 <sup>*,#</sup>	98±18 <sup>*,##</sup>	118±16 <sup>#</sup>	112±13 <sup>#</sup>

Efecto en el tiempo de latencia de caída del Rotarod de la administración subcutánea de ácido maslínico 512 mg/kg (AM-512), baclofeno 8 mg/kg (Bac-8), gabapentina 60 mg/kg (Gab-60) y sus respectivos solventes: Tween 80 al 2% en agua (TW-80), para el ácido maslínico, y suero salino (Sal), para baclofeno y gabapentina. Los resultados representan el tiempo de latencia de caída del Rotarod cuando los animales son expuestos al aparato en la *fase de evaluación* del procedimiento experimental (ver materiales y métodos para una explicación más detallada). Cada valor representa la media ± ESM de los valores obtenidos en al menos 8 animales. Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con alguno de los fármacos y su solvente: \*\* P < 0.01, \* P < 0.05; diferencias estadísticamente significativas entre las medidas post-tratamiento (30, 60, 90, 120 y 180 minutos) y la medida basal de cada grupo (tiempo 0): ## P < 0.01, # P < 0.05 (ANOVA de doble vía seguido del test de Bonferroni).

### 6.7 Efecto del inhibidor de la COX-2 rofecoxib en la alodinia mecánica inducida por capsaicina

Como se ha descrito en la experiencia 3 el ácido maslínico es capaz de inhibir la hipersensibilidad mecánica inducida por capsaicina. Con el fin de descartar que la causa de la eficacia del ácido maslínico se deba a su posible acción como inhibidor de la COX-2, se ha evaluado el efecto del inhibidor de COX-2 rofecoxib en este modelo. Hemos encontrado que ambas dosis del rofecoxib (8 y 32 mg/kg) fueron incapaces de modificar significativamente la hipersensibilidad mecánica inducida por capsaicina (Tabla 7). Estos datos concuerdan con otros previamente descritos en la literatura que demuestran que los inhibidores selectivos de la COX-2 celecoxib y rofecoxib y el inhibidor de la COX1 y COX-2 ibuprofeno no tuvieron efecto en la alodinia mecánica inducida por capsaicina [Joshi *et al.*, *Neuroscience* (2006) 143:587-596; Entrena *et al.*, *Psychopharmacology* (2009) 205: 21-23], ni en otros modelos de dolor neurogénico [Broom *et al.*, *Neuroscience* (2004) 124: 891-900].

Por tanto, puede concluirse que la acción analgésica del ácido maslínico descrita en el experimento 3 no puede ser explicable por un posible efecto inhibidor de la COX-2.

TABLA 7

*Efecto de la administración subcutánea del inhibidor de la COX-2 rofecoxib en la alodinia mecánica inducida por capsaicina*

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis (mg/kg; s.c.)</b>	<b>Tiempo de latencia (segundos)<sup>a</sup></b>	<b>Porcentaje de analgesia<sup>b</sup></b>
Solvente	-	7,41±0,94	1,58±0,91
Rofecoxib	8 mg/kg	7,99±1,20	1,15±2,81
	32 mg/kg	8,56±0,70	2,72±1,64

Efecto de la administración subcutánea (s.c.) de distintas dosis de rofecoxib (8 y 32 mg/kg) y su solvente, en la alodinia mecánica inducida por la inyección intraplantar de capsaicina (1 µg). La inyección de capsaicina fue realizada 30 min después de la aplicación subcutánea del rofecoxib o su solvente. Cada valor representa la media ± ESM de los valores obtenidos en al menos 8 animales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con rofecoxib y su solvente (ANOVA de una vía).

<sup>a</sup>Tiempo de latencia de retirada de la pata trasera sensibilizada con capsaicina tras la estimulación ipsilateral con un estímulo puntiforme (0,5 mm de diámetro) aplicado con una fuerza de 0,5 gramos (ver la sección materiales y métodos para una explicación en detalle).

<sup>b</sup>Porcentaje de analgesia calculado mediante la fórmula: % Analgesia = [TLT - TLC/TC - TLC] x 100; donde TLT es el tiempo de latencia de los ratones tratados con ácido maslínico, TLC es el tiempo de latencia de los ratones pertenecientes al grupo control (tratados con solvente) y TC es el tiempo de corte (50 s).

**REIVINDICACIONES**

5 1. Uso del ácido maslínico o cualquiera de sus derivados para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de patologías dolorosas de naturaleza nociceptiva (somática o visceral), inflamatoria o neurogénica.

10 2. Uso del ácido maslínico o cualquiera de sus derivados según cualquiera de las reivindicaciones 1 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de patologías dolorosas seleccionadas de la lista que comprende: dolor canceroso, dolor postoperatorio, dolor reumatológico, dolor neurogénico, dolor neuropático, dolor postraumático (incluyendo el dolor asociado a las lesiones deportivas), dolor inducido por fármacos (antineoplásicos, antiretrovirales, etc), dolor causado por patologías viscerales.

15 3. Uso de extracto glicolado o análogo de alto contenido en ácido maslínico según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 333 638

② Nº de solicitud: 200901745

② Fecha de presentación de la solicitud: **29.07.2009**

③ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 31/56** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2267403 A1 (UNIVERSIDAD DE GRANADA) 01.03.2007, reivindicaciones.	4-11
X	WO 03057224 A1 (NISSHIN OILLIO LTD) 17.07.2003 (resumen) (en línea) Recuperado el 26.10.2009. Recuperado de EPO EPODOC Database.	4-11
X	JUN, L. et al.: "Maslinic acid reduces blood glucose in KK-A <sub>Y</sub> mice". Biol. Pharm. Bull, 2007, vol. 30, páginas 2075-2078, página 2075, primera columna, segunda columna, líneas 1-5.	4-11
A	LUTTERODT, G.D. et al.: "Effects on mice locomotor activity of a narcotic-like principle from Psidium Guajava leaves". Journal of Ethnopharmacology, 1988, vol. 24, páginas 219-231, páginas 220, 3º y 4º párrafo.	1-11

#### 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

04.02.2010

Examinador

H. Aylagas Cancio

Página

1/4

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

A61K

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.02.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-3	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 4-11	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-3	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 4-11	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2267403 A1	01.03.2007
D02	WO 03057224 A1 Recuperado de EPO EPODOC	17.07.2003
D03	Biol. Pharm Bull. vol. 30, páginas 2075-2078	2007
D04	Journal of Ethnopharmacology, vol. 24, páginas 219-231	1988

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud se refiere al uso del ácido maslínico para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de patologías dolorosas de naturaleza nociceptiva (somática o visceral), inflamatoria o neurogénica, seleccionadas de la lista que comprende: dolor canceroso, dolor postoperatorio, dolor reumatológico, neurogénico, neuropático, postraumático, inducido por fármacos o por patologías viscerales. Así mismo, se refiere a la composición farmacéutica que comprende el ácido maslínico solo o junto con el ácido oleanólico.

El documento D1 se refiere a una composición nutracéutica obtenida de triterpenos naturales de la *Olea europaea*, concretamente ácido maslínico y ácido oleanólico. Dichas composiciones tienen aplicaciones en farmacia y alimentación. Se reivindican formas farmacéuticas orales, rectales y transdérmicas (ver reivindicaciones 15-18).

El documento D2 se refiere a preparaciones farmacéuticas que contienen inductores de la apoptosis que son ingredientes activos seleccionados del grupo de ácido maslínico, eritrodiol, uvaol y sus derivados (ver resumen).

El documento D3 se refiere a la utilización de una solución de ácido maslínico en carboximetil celulosa como hipoglucemiante en ratones (ver página 2075, primera columna y segunda columna, líneas 1-3).

A la vista de los documentos D1- D3, las reivindicaciones 4-11 que se refieren a composiciones farmacéuticas que contienen el ácido maslínico solo y junto con el ácido oleanólico, carecen de novedad y de actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la ley de patentes 11/1986.

Las reivindicaciones 1-3 hacen referencia al uso del ácido maslínico para el tratamiento de patologías dolorosas de distinta naturaleza. El documento D4 cita en su página 220, que se mascan unas hojas de un árbol cuyo nombre es *Psidium Guajava* para el dolor de muelas y estas hojas llevan en su composición taninos, beta-sitosterol, ácido maslínico, ácido guajavólico, aceites esenciales (cariofileno, bisaboleno, aromadendano, nerolidiol) y otros triterpenoides como el oleanólico y el ursólico. Por lo que no queda claro en dicho documento cual de dichos principios activos sería el responsable del tratamiento del dolor.

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados, ninguno de ellos tomados independientemente o en combinación nos conducirían al uso que se reivindica en las reivindicaciones 1-3.

En consecuencia el contenido de dichas reivindicaciones presenta novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la ley de patentes 11/1986.