



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 131 467**

②① Número de solicitud: 009701029

⑤① Int. Cl.⁶: A61K 31/19

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **12.05.1997**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.1999**

Fecha de concesión: **10.01.2000**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.2000**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.04.2000

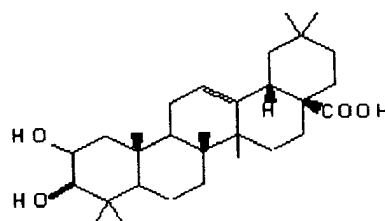
⑦③ Titular/es: **UNIVERSIDAD DE GRANADA
C/ Santa Lucía, nº 2, 2ª planta
Granada, ES**

⑦② Inventor/es:
**García-Granados López de Hierro, Andrés;
Martínez Rodríguez, Antonio;
Parra Sánchez, Andrés;
Rivas Sánchez, Francisco;
Osuna Carrillo de Albornoz, Antonio;
Mascaró Lazcano, Carmen;
Rodríguez Cabezas, Nieves y
Kalifa, Latifa**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Utilización de ácido maslínico como inhibidor de serin-proteasas para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos del género *Cryptosporidium*.**

⑤⑦ Resumen:
Utilización de ácido maslínico como inhibidor de serin-proteasas para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos del género *Cryptosporidium*. El ácido 2-alfa,3-betadihidroxi-28-carboxioleaneno (ácido maslínico) se utiliza, debido a su acción como inhibidor de las serin-proteasas que el parásito produce para la invasión celular, en la obtención de preparados farmacéuticos destinados al tratamiento de las enfermedades causadas en humanos y animales por las especies del género *Cryptosporidium*.



ES 2 131 467 B1

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

DESCRIPCION

Utilización de ácido maslínico como inhibidor de serin-proteasas para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos del género *Cryptosporidium*.

Objeto de la invención

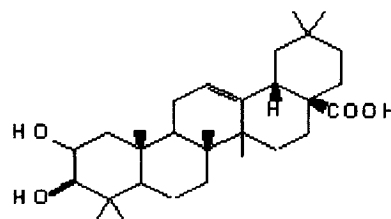
Cryptosporidium parvum es un importante agente de procesos diarreicos con malabsorción. En población normal la criptosporidiosis cursa como una afección autolimitada con fiebre (57%), vómitos (48%), y otras alteraciones que duran una media de 9 días. En la inmunodepresión congénita, yatrogénica o adquirida, el parásito difunde a vías pulmonares y biliares, al tiempo que la multiplicación intestinal no cesa, conduciendo a diarreas incontroladas para las que no existe terapia específica. En este sector de población de alto riesgo son muy importantes las medidas preventivas, pues es un protozoo ubicuo, afecta a otros mamíferos, y además puede contraerse a partir del agua de suministro. Las epidemias por vía hídrica se comenzaron a detectar en 1984 en USA, siendo la más importante la de Milwaukee en 1993, con unos 403.000 afectados. *Cryptosporidium*, al igual que otros coccidios, vierte enzimas que le permiten fijarse a la célula huésped, donde va a desarrollar un complejo ciclo biológico. El objeto de la invención es la utilización de un inhibidor de la actividad de serin-proteasas, para la obtención de preparados farmacéuticos destinados tanto a una terapia preventiva, como limitativa o incluso curativa de la criptosporidiosis.

Estado de la técnica

La ausencia de una terapia específica para la criptosporidiosis en individuos inmunocompetentes, se solventa con un tratamiento sintomático, dado que el proceso es autolimitado. Urge, sin embargo, el desarrollo de un tratamiento eficaz para afectados de SIDA, o de cualquier otro tipo de proceso inmunosupresor, donde la afección es incontrolable, pudiendo tener un desenlace fatal. Las terapias actualmente aceptadas indican la necesidad de un control previo de *Cryptosporidium*, antes de cualquier otro tratamiento en los pacientes de SIDA, siendo la Paromomicina, tóxica, a dosis terapéuticas, e ineficaz en muchos casos, el fármaco que se viene empleando para ello, tras haberse realizado ensayado multitud de compuestos, tanto in vivo como in vitro, e incluso procedimientos de inmunoprofilaxis, también con letrazuril (Hoepelman, A.I.M, *J. Antimicrob. Chemother.* (1996) 37, 871-880; Loeb, M., Walach, C., Phillips, J., Fong, I., Salit, I., Rachlis, A., Walmsley, S. J. *Acquired Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, (1995) 10, 48-53). Los medicamentos antiparasitarios tratan de abordar la infección por el parásito desde diversos puntos de vista. Una de las posibles vías de actuación es tratar de proteger la invasión de células sanas frente a la invasión del parásito. Los más recientes avances en la bioquímica y biología molecular de los protozoos parásitos se centran sobre moléculas clave en la vida y actuación del parásito. Las proteasas son un grupo de enzimas que juegan un papel vital en los procesos de interiorización de los protozoos parásitos en sus células huéspedes, por lo que estas proteasas son actualmente un objeto de

estudio importante para el desarrollo de la nueva quimioterapia antiparasitaria (McKerrow, J.H., Sun, E., Rosenthal, P.J., and Bouvier, J.; *Annu. Rev. Microbiol.* (1993) 47, 821-53). Las especies de *Cryptosporidium* emplean serin-proteasas para acceder a las células epiteliales en las que se desarrollan. Para el control del proceso, se han ensayado algunos inhibidores de serinproteasas (alpha-1-antitripsina (AAT), antipaina, aprotinina, leupetina, metoxysuccinil-ala-ala-pro-valina clorometilcetona (MAAPVCK), inhibidor de tripsina de soja (SBTI) y fenilmetilulfonil fluoruro (PMSF), Forney, J.R., Yang, S., Du, C., Healey, M.C. *J. Parasitol* (1996) 82, 638-640) para el control de la infección, con resultados poco prometedores.

El ácido maslínico (2-alfa,3-beta-dihidroxi-28-carboxioleaneno), también denominado ácido crataególico, es un ácido poco repartido en la naturaleza, habiendo sido detectado en una decena de plantas (Dirección Internet de la base de datos fitoquímica del gobierno americano <http://probe.nalusda.gov:8300/cgi-bin/browse/phytochemdb>). Se conoce su actividad como antihistamínico y antiinflamatorio (Dirección Internet <http://probe.nalusda.gov:8300/cgi-bin/browse/phytochemdb>), 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). Recientemente ha sido realizada una solicitud de patente por la Universidad de Granada relativa al aprovechamiento industrial a partir de los subproductos industriales de la molturación de la aceituna en cualquiera de sus variantes (*Aprovechamiento industrial de los ácidos oleanólico y maslínico contenidos en los subproductos de la molturación de la aceituna (P9601652)*).



Acido maslínico

Descripción de la invención

Hemos realizado experiencias para determinar la utilidad del ácido maslínico, producto natural aislado industrialmente de los subproductos de la molturación de la aceituna en la inhibición de la invasión in vitro de células MDCK pro esporozoitos de *C. parvum*. Para ello se siguió el procedimiento de cultivo previamente descrito (Rosales, M.J., Cifuentes, J y Mascaró, C., *Experimental*

Parasitology (1993), **76**, 209-212), con un tiempo de interacción de 2 horas, una razón 1:1 esporozoito/célula, y efectuando recuentos de los cultivos controles y experimentales a intervalos de 24 horas, tras la interacción. Los resultados obtenidos (ver figura 1) indican que a concentraciones de aproximadamente 45 microgramos/mililitro se inhibe al 100% la entrada del *Cryptosporidium* en las células, sin observar daño apreciable en las mismas hasta una concentración entre 50 y 60 microgramos/mililitro, concentraciones para las que, de todas formas, la inhibición de la infección es total (100%). Estos resultados, superiores a

lo conocido y sin manifestar toxicidad a dosis terapéuticas, constituyen la base para la preparación de formulaciones farmacéuticas que contengan ácido maslínico, sólo o en combinación con otras materias que complementen o sinergicen su acción, como materia activa frente a la infección por *Cryptosporidium*, en una cantidad que puede llegar en caso necesario hasta 2500 mg/día de ácido maslínico durante 2/3 semanas.

Explicación de la figura 1

Se representa el % de inhibición de la infección de células sanas en función de la concentración de ácido maslínico (microgramos/mililitro)

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Utilización de inhibidores enzimáticos en la preparación, solo o en combinación con otros agentes, de productos para el tratamiento de las enfermedades humanas o animales causadas por los parásitos patógenos del género *Cryptosporidium*, **caracterizada** porque el producto es inhibidor de la actividad de serin-proteasas.

2. Utilización de inhibidores enzimáticos en la preparación, solo o en combinación con otros agentes, de productos para el tratamiento de las enfermedades humanas o animales causadas por los parásitos patógenos del género *Cryptosporidium*, según reivindicación primera **caracteri-**

zada porque el inhibidor empleado es 2-alfa,3-beta-dihidroxi-28-carboxioleaneno (ácido maslínico).

3. Utilización de inhibidores enzimáticos, según reivindicaciones primera y segunda, **caracterizado** por la utilización de los mismos en cualquier clase de forma farmacéutica.

4. Utilización de inhibidores enzimáticos, según reivindicaciones primera a tercera, **caracterizado** por la utilización de los mismos en cualquier forma de administración galénica.

5. Utilización de inhibidores enzimáticos, según reivindicaciones primera a cuarta, **caracterizado** por la utilización de los mismos en cualquier dosis por individuo y día.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

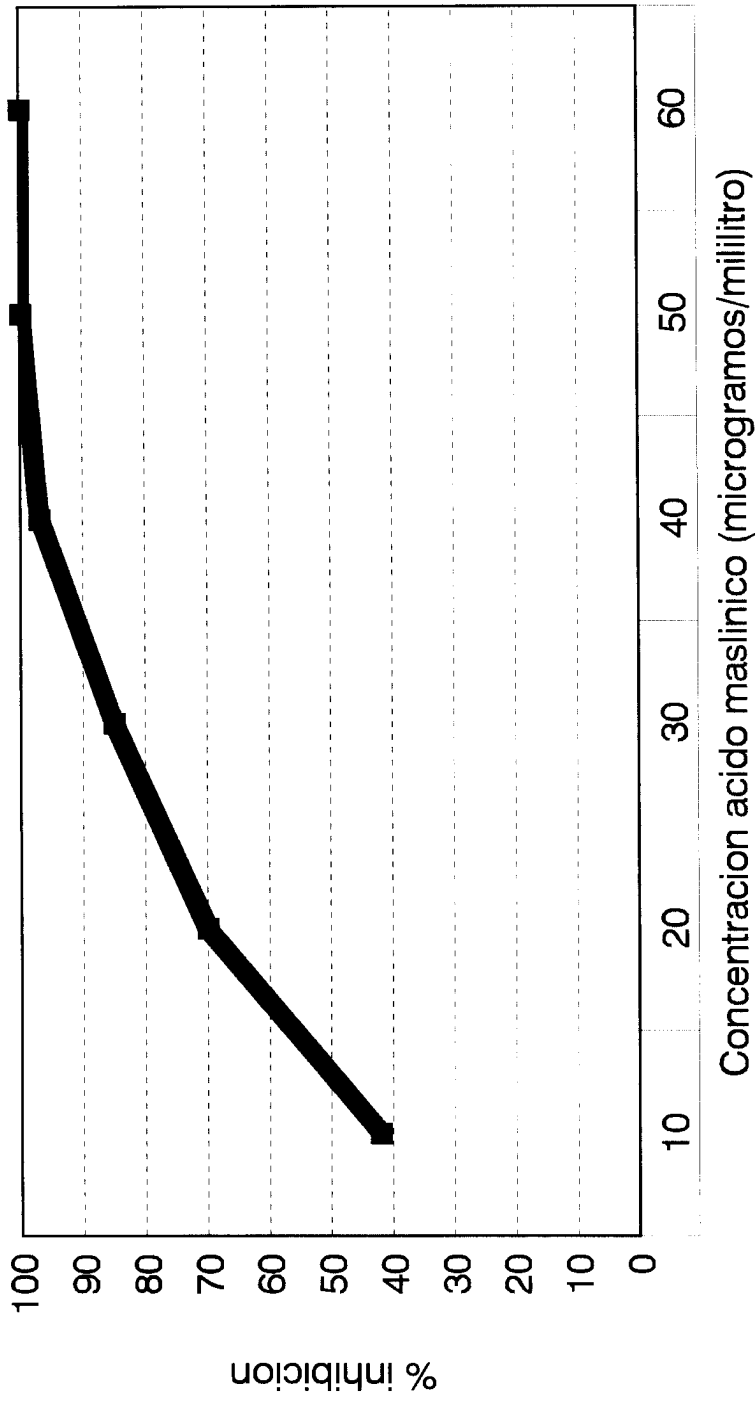


FIGURA 1



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: A61K 31/19

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9712582 A2 (AGRIMMUNE INC.) 10.04.1997, todo el documento.	1,3-5
X	FORNEY, J.R. et al.: "Interaction of the human serine protease inhibitor alpha-1-antitrypsin with Cryptosporidium parvum", J. Parasitol. (1996), Vol. 82 (3), páginas 496-502, todo el documento.	1,3-5
X	FORNEY, J.R. et al.: "Efficacy of serine protease inhibitors against Cryptosporidium parvum infection in a bovine fallopian tube epithelial cell culture system", J. Parasitol. (1996), Vol. 82 (4), páginas 638-640, todo el documento.	1,3-5
X	FORNEY, J.R. et al.: "Protease activity associated with excystation of Cryptosporidium parvum oocysts", J. Parasitol. (1996), Vol. 82 (6), páginas 889-892, todo el documento.	1,3-5

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 n.º:

Fecha de realización del informe

08.06.99

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1