



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 267 402**

② Número de solicitud: 200502086

⑤ Int. Cl.:  
**A61K 31/216** (2006.01)  
**A61K 8/14** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **17.08.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2007**

Fecha de la concesión: **27.02.2008**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.03.2008**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2008**

⑰ Titular/es: **Universidad de Granada  
Hospital Real - Cuesta del Hospicio, s/n  
18071 Granada, ES**

⑱ Inventor/es:  
**García-Granados López de Hierro, Andrés**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Formulación de triterpenos naturales obtenidos del género Olea en liposomas.**

㉒ Resumen:

Formulación de triterpenos naturales obtenidos del género Olea en liposomas, concretamente por triterpenos del grupo consistente en ácido maslínico y ácido oleanólico y/o sus sales y liposomas. Los triterpenos son incorporados a los liposomas como productos naturales contenidos en especies, subespecies o variedades del género Olea.

ES 2 267 402 B1

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

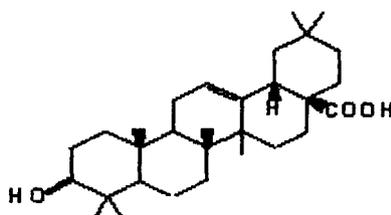
## DESCRIPCIÓN

Formulación de triterpenos naturales obtenidos del género *Olea* en liposomas.

5 La presente invención consiste en una formulación en liposomas de triterpenos naturales obtenidos del género *Olea*, concretamente por triterpenos del grupo consistente en ácido maslínico y ácido oleanólico y/o sus sales y liposomas.

## Estado de la técnica

10



ACIDO OLEANOLICO

15

20

El ácido oleanólico (3-beta-hidroxi-28-carboxioleanano) es un ácido triterpénico ubícuamente repartido en el reino vegetal. Así, la base de datos fitoquímica del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos ([http://www.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/chemdisp.xsql?chemical=OLEANOLIC ACID](http://www.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/chemdisp.xsql?chemical=OLEANOLIC%20ACID)) recoge su presencia en 130 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, uterotónico, etc hasta 38 actividades diferentes). Son continuas las publicaciones sobre la posible actividad biológica de este ácido y de sus glicósidos. Así, se ha estudiado su actividad como inhibidor de la proliferación de células leucémicas (Essady, D., Najid, A., Simo, A., Denizot, Y., Chulia, A.J. and Delage, C.; *Mediators of Inflammation* (1994) 3, 181-184), como hipoglucemiante (Yoshikawa, M., Matsuda, H., Harada, E., Mukarami, T., Wariishi, N., Murakami, N. and Yamanara, J.; *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, (1994) 42, 1354-356) antitumoral (Ohigashi, H., Mukarami, A. and Koshimizu, K *ACS Symposium Series* (1994) 547, 251-261), productor de efectos antagonistas en el shock anafiláctico (Zhang, L.R. and Ma, T.X.; *Acta Pharmacológica Sinica* (1995) 16, 527-530), hepatoprotector (Liu, J., Liu, Y.P., Parkinson, A. and Klaasen, C.D.; *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, (1995) 275, 768-774; Connolly, J.D. and Hill, R.A. *Natural Product Reports* 12, 609-638 (1995), antiinflamatorio (Recio, M.D., Giner, R.M., Manez, S. and Rios, J.L.; *Planta Medica* (1995) 61, 182-185. Se ha publicado una revisión específica de la actividad farmacológica del ácido oleanólico (Liu, J. *Journal of Ethnopharmacology* (1995) 49, 57-68).

25

30

35

40

45

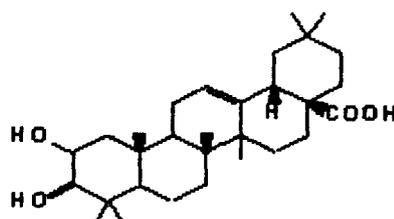
Otros derivados del ácido oleanólico, como el ácido equinocístico (16-hidroxioleanólico) han demostrado efectos inhibidores frente a la replicación del HIV en células H-9 con valores  $EC_{50}$  de 2.3 mM (Anti AIDS agents, 21. Triterpenoid saponins as anti-HIV principles from fruits of *Gleditsia japonica* and *Gymnocladus chinensis*, and a structure-activity correlation, Konoshima, Takao; Yasuda, Ichiro; Kashiwada, Yoshiki; Cosentino, L. Mark; Lee, Kuo-Hsiung, *J. Nat. Prod.*, **58**(9), 1372-7, (1995)). Otros muchos derivados directos han demostrado ser antagonistas del leucotrieno  $D_4$  Leukotriene  $D_4$  antagonists in *Tripterygium wilfordii*, Morota, Takashi; Saitoh, Kazuko; Maruno, Masao; Yang, Chun-Xin; Qin, Wan-Zhang; Yang, Bing-Hui, *Nat. Med.*, **49**(4), 468-71 (1995).

50

55

Quizá la mejor prueba del interés que suscita a nivel mundial está en las patentes internacionales que sobre este ácido existen: Use of oleanolic acid as a vasodilator and restorer agent for endothelial dysfunction (WO2004ES00190 20040430); Cosmetic and dermatopharmaceutical compositions for skin prone to acne (WO2002FR03344 20021001); Cosmetic composition for care of sensitive skin includes oleanolic acid or vegetable extract rich in oleanolic acid, and at least one other vegetable extract chosen from shea-butter flower and *solanum lycocarpum* (FR20000008758 20000705); Process for preparing food products fortified with oleanolic acid (US19990468637 19991222); Oleanolic acid-based anti-pruritus agent (JP19970183075 19970623); Angiogenesis inhibitor composition comprising oleanolic acid (KR19920021117 19921111).

60



ACIDO MASLINICO

65

El ácido maslínico (2-alfa,3-betadihidroxi-28-carboxioleanano), también denominado ácido crataególico, es un ácido mucho menos repartido en la naturaleza, habiendo sido detectado en 23 plantas (<http://www.ars-grin.gov:8080/npgspublxsq/duke/chemdisp.xsql?chemical=MASLINIC-ACID>). Se conoce su actividad como antihistamínico y antiinflamatorio (<http://www.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/chemdisp.xsql?chemical=MASLINIC-ACID>), 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).

Se ha descubierto recientemente que el ácido maslínico posee una potente actividad inhibitoria *in vitro* de la proteasa del virus del sida (HIV-1) (Anti-HIV Triterpene Acids from *Geum japonicum*, Xu, H.X.; Zeng, F.; Wan, M.; Sim, Keng-Yeow *J. Nat. Prod.*, **59**(7), 643-645 (1996)). Es además un producto de futuro como lo demuestra que una búsqueda farmacófora de inhibidores de proteasas del HIV-1, realizada en el Instituto Nacional del Cáncer (Bethesda, USA) ha señalado a un derivado del ácido maslínico como una base prometedora del desarrollo futuro en esta actividad (Discovery of Novel, Non-Peptide HIV-1 Protease Inhibitors by Pharmacophore Searching, Wang, Shaomeng; Milne, G. W. A.; Yan, Xinjian; Posey, Isadora; Nicklaus, Marc C.; Graham X Lisa; Rice, William G., *J. Med.; Chem.*, **39**(10), 2047-54 (1996)).

Como resultado de las pruebas biológicas que se ha realizado en la Universidad de Granada, sola o en colaboración con otras Universidades o centros de Investigación, se han registrado, hasta ahora, dos patentes para la obtención de medicamentos como inhibidores de proteasas para el tratamiento de las enfermedades producidas por los protozoos del género *Cryptosporidium* (P9701029 Utilización de ácido maslínico como inhibidor de serin-proteasas para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos de género *Cryptosporidium*). Además, los ensayos realizados sobre línea celular MDCK muestran un porcentaje de inhibición de infección 92,3% a 37 mg/mL. En el caso de los virus causantes del sida, las pruebas han dado lugar a una patente (P9702528 Utilización de ácido maslínico como inhibidor de proteasas para el tratamiento de la enfermedad causada por los virus de la inmunodeficiencia adquirida), ya que se ha demostrado que puede actuar intracelularmente y que inhibe considerablemente la salida del virus desde la célula infectada hacia el medio, mecanismo que parece que funciona con el concurso de serin proteasas. Más recientemente, los Departamentos de Farmacología y Química Orgánica de la Universidad de Granada han efectuado un estudio de *hepatoprotección* con magníficos resultados, lo que se recoge en la publicación "Antioxidant Activity of Maslinic Acid, a Triterpene obtained from *Oleo europaea*" M.Pilar Montilla, Ahmad Agil, M. Concepción Navarro, M. Isabel Jiménez, Andrés García-Granados, Andrés Parra y Matilda Cabo, *Planta Medica* 2003, **69**, 472-474, comprobándose que el ácido maslínico disminuye los niveles de lipoperóxidos y la susceptibilidad de los hepatocitos de membrana a la peroxidación lipídica (LPO), produciendo por tanto una resistencia en ratas al estrés oxidativo. Por otra parte, investigadores de la Universidades de Granada y de Jaén han realizado detalladas experiencias empleando como animales de experimentación la trucha arcoiris, demostrando que la aditivación de su alimentación con ciertas cantidades de ácido maslínico redundan en una mejora importantísima del órgano y de la función hepática y, por tanto, en la salud del animal. Todos estos resultados han sido recogidos en la patente, titularizada por la Universidad de Granada "Ácido maslínico como aditivo en producción animal, P200401679".

Como en el caso del anteriormente mencionado ácido oleanólico, el creciente interés de este producto lo demuestra el gran número de patentes en registro en las que el ácido maslínico actúa como componente activo: Antitumor agent US20030355201 20030131; Apoptosis inductor (WO2002JP13663 20021226); Antiobestic foods and drinks (WO2002JP11608 20021107); External agent for the skin and whitening agent (US20020259323 20020930); Antiobestic drugs and materials thereof (WO2002JP07709 20020730); Drugs for vascular lesion (WO2002JP03189 20020329); Antitumor food or beverage (WO2001JP11374 20011225).

Por otra parte los liposomas son vesículas esféricas obtenidas por la interacción de fosfolípidos entre sí. Su formación no es espontánea y está inducida por la presencia de agua.

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, es decir constan de dos partes diferentes una de las cuales es hidrofílica y otra hidrófoba. Esta característica de los fosfolípidos es la causante de que, cuando son dispersados en agua, las moléculas se orienten en el espacio formando estructuras micelares que denominamos liposomas. Los liposomas se caracterizan por ser estructuras esféricas en el interior de las cuales se integra el medio acuoso utilizado para su dispersión.

Los liposomas se utilizaron inicialmente como modelos de membrana celular para estudios biofísicos debido a la similitud estructural con las membranas citoplasmáticas de la mayoría de las células de los organismos vivos. Fue precisamente esta similitud la que sugirió la idea de su utilización como vehículos transportadores de sustancias para la administración tópica y parenteral.

### Descripción de la invención

Para la extracción de los triterpenos presentes en la composición con liposomas se puede utilizar, entre otros procedimientos, el descrito en la una patente desarrollada y titularizada por la Universidad de Granada (ES211498, Procedimiento de aprovechamiento industrial de los ácidos 3betahidroxiolean-12-en-28-óico (oleanólico) y 2alfa,3betadihidroxiolean-12-en-28-óico (maslínico) contenidos en los subproductos de la molturación de la aceituna) que per-

## ES 2 267 402 B1

mite obtener industrialmente estos dos ácidos, por separado y en alto grado de pureza, a partir de subproductos sólidos de la molturación industrial de la aceituna, por cualquiera de los procedimientos ahora empleados (prensas, continuo en tres fases y en el denominado de dos fases), lo que constituye una fuente asequible e inagotable de los mismos. El proceso de separación establecido es totalmente físico y sumamente eficaz, permitiéndonos aislar estos productos en las proporciones deseadas a partir de las complejas mezclas originales. Esto nos permite disponer de los ácidos oleanólico y maslínico naturales recuperándolos de la propia aceituna previamente molturada, al ser estos triterpenos extremadamente hidrofóbicos se asocian inmediatamente a la parte hidrofóbica de los fosfolípidos con lo que su incorporación es sencilla e inmediata. La cantidad de sustancia a incorporar está limitada por la cantidad de fosfolípidos presentes en la dispersión liposómica.

Para la preparación de la formulación en liposomas se toma una cantidad determinada de liposomas esféricos (no laminares) ya disponibles comercialmente y simplemente se añade el ácido maslínico y/o oleanólico en polvo fino y se remueve suavemente quedando el producto totalmente disperso en los liposomas.

Esta forma de preparación admite desde un 0,0001% hasta un 20% en peso de producto final en peso de triterpeno natural en liposomas.

Así, conseguimos una formulación de triterpenos naturales obtenidos del género *Olea* en liposomas que está compuesta por al menos uno de los triterpenos del grupo consistente en ácido maslínico y ácido oleanólico y/o sus sales y liposomas. Los triterpenos son incorporados a los liposomas como productos naturales contenidos en especies, subespecies o variedades del género *Olea* que contienen al menos uno de los triterpenos en una cantidad mayor de 0.001% de la materia vegetal seca, o bien los triterpenos son extractados de los residuos de molturación de los frutos de especies, subespecies o variedades del género *Olea* que contienen al menos uno de los triterpenos en una cantidad mayor de 0.001 de los residuos secos.

Además, los triterpenos utilizados pueden estar en forma de concentrado o extracto de especies, subespecies o variedades del género *Olea*, y en forma sólida o líquida y al menos uno de los triterpenos seleccionados está presente en una cantidad de entre el 10 al 95% de la mezcla total de triterpenos.

REIVINDICACIONES

5 1. Formulación de triterpenos naturales obtenidos del género Olea en liposomas **caracterizada** por estar compuesta por al menos uno de los triterpenos del grupo consistente en ácido maslínico y ácido oleanólico y/o sus sales y liposomas.

10 2. Formulación de triterpenos naturales obtenidos del género Olea en liposomas según reivindicación primera **caracterizada** porque los triterpenos son incorporados como productos naturales contenidos en especies, subespecies o variedades del género Olea a los liposomas.

15 3. Formulación de triterpenos naturales obtenidos del género Olea en liposomas según reivindicación primera **caracterizada** porque los triterpenos son extractados de los residuos de molturación de los frutos de especies, subespecies o variedades del género Olea.

20 4. Formulación de triterpenos naturales obtenidos del género Olea en liposomas según reivindicaciones anteriores **caracterizada** porque los triterpenos están en forma de concentrado o extracto de especies, subespecies o variedades del género Olea, en forma sólida o líquida.

25 5. Formulación de triterpenos naturales obtenidos del género Olea en liposomas según reivindicación segunda **caracterizada** porque la materia vegetal del género Olea es obtenida de especies, subespecies o variedades del género Olea que contengan al menos uno de los triterpenos en una cantidad mayor de 0.001% de la materia vegetal seca.

30 6. Formulación de triterpenos naturales obtenidos del género Olea en liposomas según reivindicación cuarta **caracterizada** porque los residuos de molturación de frutos del género Olea son obtenidos de especies, subespecies o variedades de Olea que contengan al menos uno de los triterpenos en una cantidad mayor de 0.001 de los residuos secos.

35 7. Formulación de triterpenos naturales obtenidos del género Olea en liposomas según reivindicación primera **caracterizada** porque al menos uno de los triterpenos seleccionados está presente en una cantidad de entre el 10 al 95% de la mezcla total de triterpenos.

40 8. Formulación de triterpenos naturales obtenidos del género Olea en liposomas según reivindicación 1 en donde dicha composición contiene del 0,0001% al 20% en peso de triterpeno natural en liposomas.

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 267 402

② Nº de solicitud: 200502086

③ Fecha de presentación de la solicitud: 17.08.2005

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FEDELI, E. et al.: "oleanolic acid activity in topical preparations", (1985), Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, vol. 62(8), pp.: 419-21, ISSN: 0035-6808, todo el documento.	1-8
X	EP 1410790 A1 (AMOREPACIFIC CORPORATION) 21.04.2004, todo el documento.	1-8
X	WO 03028692 A2 (SEDERMA) 10.04.2003, todo el documento.	1-8

#### 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

09.02.2007

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K 31/216** (2006.01)

**A61K 8/14** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)