



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 328 999**

② Número de solicitud: 200801069

⑤ Int. Cl.:

**A61K 31/56** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **03.04.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2009**

Fecha de la concesión: **11.10.2010**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **27.10.2010**

⑤ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**27.10.2010**

⑦ Titular/es: **BIOMASLINIC, S.L.**  
**Edificio Bic Granada**  
**Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud**  
**18100 Armilla, Granada, ES**  
**Universidad de Granada**

⑧ Inventor/es: **Prados Osuna, José;**  
**García-Granados López de Hierro, Andrés;**  
**Parra Sánchez, Andrés y**  
**Martínez Rodríguez, Antonio**

⑨ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

④ Título: **Uso del ácido maslínico para el tratamiento de patologías y sus síntomas mediante la inhibición de COX-2.**

⑦ Resumen:

Uso del ácido maslínico para el tratamiento de patologías y sus síntomas mediante la inhibición de COX-2.

La presente invención se refiere al uso del ácido maslínico o mezclas naturales, sintéticas o semisintéticas ricas en maslínico, o de una composición que contenga dicho ácido, para el tratamiento de procesos patológicos que cursen con la activación de la COX-2. Entre otros, para el tratamiento sintomático y/o regenerativo de artrosis, artritis reumatoide, fibromialgias, ciática y otras molestias articulares de difícil diagnóstico. También se refiere a su administración por vía tópica.

ES 2 328 999 B1

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

## DESCRIPCIÓN

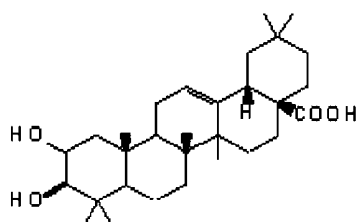
Uso del ácido maslínico para el tratamiento de patologías y sus síntomas mediante la inhibición de COX-2.

5 La presente invención se refiere al uso del ácido maslínico y cualquiera de sus derivados para el tratamiento de procesos patológicos relacionados con la inhibición de la ciclooxigenasa-2 endógena (COX-2). Más concretamente para el tratamiento sintomático y/o regenerativo de artrosis, artritis reumatoide, fibromialgias, ciática y otras molestias articulares de difícil diagnóstico. También se refiere a la administración por vía tópica de una composición, que comprende ácido maslínico, cualquiera de sus derivados, o mezclas naturales, sintéticas o semisintéticas ricas en maslínico o sus derivados.

## Estado de la técnica anterior

15 El ácido oleanólico (3-beta-hidroxi-28-carboxiolean-12-eno) es un ácido triterpénico ubícuamente 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).

20 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 antiinflamatorio, 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].



## Acido maslínico

40 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.

45 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; lesiones vasculares WO02078685.

50 En algunas publicaciones se sugiere que este triterpeno puede tener también una actividad antiinflamatoria (Marquez-Martin A, De La Puerta R, Fernandez-Arche A, Ruiz-Gutierrez V, Yaqoob P. *Cytokine*. (2006) Dec; 36 (5-6):211-7). En este documento también se describe que el ácido maslínico inhibe la liberación de IL-6 y TNF $\alpha$  y la producción de NO y del peróxido de hidrógeno (ROS) en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS, un efecto que los mismos autores no encuentran en células mononucleares de sangre periférica humana. 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.

60 Por otro lado, las prostaglandinas son sintetizadas a partir del ácido araquidónico (y de otros ácidos grasos insaturados C20 llamados eicosanoides) siguiendo la vía metabólica de la ciclooxigenasa (COX), una enzima ampliamente distribuida que es capaz de producir un ciclo y de introducir oxígenos en los precursores para crear las prostaglandinas que derivan todas ellas ácido prostanoico. Existen dos isoformas distintas bien identificadas de ciclooxigenasa que son la COX-1 y COX-2. La COX-1 se expresa constitutivamente en muchos tejidos, donde regula funciones fisiológicas importantes. Por ejemplo, la COX-1 cataliza la producción de prostaglandinas por el endotelio y por la mucosa gástrica, lo que conduce a efectos antitrombogénicos y citoprotectores, respectivamente. La COX-2, que es la forma inducible, es indetectable en la mayor parte de los tejidos. La COX-2 es una isoforma específica derivada de un gen diferente del que codifica la COX-1. La expresión de la COX-2 aumenta durante el desarrollo y la inflamación, pero su expresión constitutiva permanece baja en la mayoría de los órganos, excepto en el cerebro.

## ES 2 328 999 B1

Las prostaglandinas, en particular la PGE<sub>2</sub>, ejercen múltiples funciones fisiológicas y fisiopatológicas. Así, las concentraciones bajas de PGE<sub>2</sub> mantienen la integridad de la mucosa gástrica normal y la homeostasis de los fluidos y electrolitos mientras que los niveles de este mediador están implicados en los procesos inflamatorios.

5 Otros metabolitos del ácido araquidónico son los isoprostranos. Estos metabolitos son parecidos estructuralmente a las prostaglandinas y son generados por la oxidación de los ácidos grasos de la membrana plasmática.

En la actualidad está ampliamente reconocido que los isoprostranos representan un de los mejores marcadores celulares y sistémicos del estrés oxidativo. Ya que se ha demostrado la actividad antioxidante del ácido maslínico es posible que este compuesto pueda inhibir la formación de isoprostranos (Marquez-Martin A, De La Puerta R, Fernandez-Arche A, Ruiz-Gutierrez V, Yaqoob P. Cytokine. (2006) Dec; 36(5-6):211-7); Montilla MP, Agil A, Navarro MC, Jimenez MI, Garcia-Granados A, Parra A, Cabo MM. Planta Med. (2003) May;69(5):472-4).

Según el Centro Médico de la Universidad de Maryland en lo que a tratamiento de la artritis reumatoide, este tratamiento se puede hacer, en principio, con inhibidores de la COX-2, indicando que “Los inhibidores COX-2 bloquean una enzima que favorece la inflamación, llamada COX-2” pero no contemplan tratamientos eficaces por administración tópica. Inicialmente se creía que esta clase de drogas funcionaba tan bien como las drogas anti-inflamatorias sin esteroides (NSAID), pero con menos problemas estomacales. Sin embargo, numerosos informes de ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares han llevado a la FDA a evaluar de nuevo la relación riesgo-beneficio de los COX-2. El rofecoxib (Vioxx<sup>®</sup>) y el valdecoxib (Bextra<sup>®</sup>) han sido retirados del mercado norteamericano después de los informes sobre ataques cardíacos en pacientes que los estaban tomando. Celecoxib (Celebrex<sup>®</sup>) aún está disponible, pero con una etiqueta de fuerte advertencia y con la recomendación de que sea prescrito en la dosis más baja y durante el menor tiempo posible. Los pacientes deben consultarle al médico si este medicamento es apropiado y seguro para ellos.

Los medicamentos antimaláricos como hidroxiquina (Plaquenil<sup>®</sup>) y sulfasalazina (Azulfidine<sup>®</sup>) también son beneficiosos por lo general en unión con metotrexato. Pero los beneficios de estos medicamentos pueden tomar de semanas a meses para manifestarse y ya que están asociados con efectos colaterales tóxicos, es un imperativo realizar control frecuente con pruebas sanguíneas mientras se estén usando.

Los inhibidores del factor de necrosis tumoral (TNF) son un tipo de medicamentos relativamente nuevos que se utilizan para tratar la enfermedad autoinmune y son entre otros: etanercept (Enbre<sup>®</sup>I), infliximab (Remicade<sup>®</sup>) y adalimumab (Humira<sup>®</sup>). Adalimumab<sup>®</sup> y Etanercept<sup>®</sup> son medicamentos inyectables, mientras que Infliximab se suministra por vía intravenosa.

Otro medicamento relativamente nuevo es la Anakinra inyectable (Kineret<sup>®</sup>), una proteína artificial que bloquea la proteína inflamatoria interleucina-1. Este medicamento se utiliza para disminuir la progresión de moderado a grave de la artritis reumatoidea activa en pacientes de más de 18 años que no hayan respondido a uno o más de los DMARD (en inglés Medicamentos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad). El Kineret<sup>®</sup> se puede utilizar con otro DMARD o con inhibidores del factor de necrosis tumoral.

Otros medicamentos que suprimen el sistema inmune, como azatioprina (Imuran<sup>®</sup>) y ciclofosfamida (Cytosan<sup>®</sup>), se utilizan algunas veces en personas que han fracasado con otras terapias. Estos medicamentos, que están asociados con efectos secundarios tóxicos, se reservan generalmente para casos severos de artritis reumatoidea.

Se desconoce la existencia de un tratamiento eficaz y sencillo de administrar para el tratamiento sintomático y/o regenerativo de artrosis, de artritis reumatoide u otras molestias articulares de difícil diagnóstico que actúe directamente sobre condrocitos y logre un tratamiento eficaz con eliminación rápida y prolongada de las sintomatologías indicadas.

### 50 Explicación de la invención

La presente invención describe el uso del ácido maslínico o cualquiera de sus derivados para el tratamiento de cualquier patología que curse con activación de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2).

55 En este sentido, en la presente invención se demuestra la actividad del ácido maslínico como inhibidor de la actividad de la COX-2 inducida en condrocitos humanos y por tanto la utilidad de este ácido en el tratamiento de enfermedades que cursen con la activación de dicha enzima COX-2.

Se demuestra también que el ácido maslínico no solo es capaz de reducir la inflamación, asociada a este tipo de enfermedades, sino que además interviene en la reducción o eliminación de la sintomatología y en la regeneración tisular condrocitaria demostrando efectos duraderos.

Por todo lo anteriormente citado, la invención versa sobre el tratamiento sintomático y/o regenerativo de enfermedades tales como artrosis, artritis reumatoides, fibromialgias, ciática, síndrome del saltador, protuberancia de la articulación metatarsofalángica (juanete) y procesos que responden a AINES (Antiinflamatorios No Esteroides) específicos para COX-2, con una composición que comprende ácido maslínico o cualquiera de sus derivados. Este tratamiento se lleva a cabo con una administración sencilla y es eficaz puesto que, entre otras cosas, actúa directamente sobre los condrocitos o tejidos afectados. En particular se demuestra en la presente invención la eficacia en el

## ES 2 328 999 B1

tratamiento sintomático y/o regenerativo de artrosis y artritis reumatoide con la eliminación rápida y prolongada de sus sintomatologías.

5 En esta invención, se demuestra la eficacia del tratamiento incluso por administración tópica. Es muy importante destacar este hecho, puesto que otros AINES inhibidores de la COX-2 no muestran eficacia cuando se administran vía tópica y además, su administración por otras vías, presenta efectos secundarios o colaterales adversos.

10 El ácido maslínico, se puede obtener bien sintética o naturalmente. Las composiciones que comprenden este ácido maslínico, incluyen en su definición, el uso de extractos de plantas que contienen ácido maslínico, extractos de los subproductos de procesado industrial de la planta o sus frutos o un subproducto industrial de la planta que contiene una concentración mayor de ácido maslínico que la originalmente presente en la planta. Por ejemplo, pero sin limitarse, extractos de plantas del género *Olea*, más particularmente la especie *O. europea*. Además del ácido maslínico de este tipo, también se pueden utilizar sus derivados, entendiéndose por derivados en la presente invención, sus sales, o derivados aceptados en farmacopeas que faciliten la absorción y transporte en los tejidos a tratar. Más particularmente  
15 sus sales sódicas, potásicas o de aminas biológicamente aceptables.

Estos hechos se demuestran mediante las siguientes experiencias realizadas:

- 20 ■ Se ha determinado el efecto del ácido maslínico y derivados sobre la expresión de la proteína COX-2 en monocitos primarios humanos de sangre periférica.
- Se ha determinado el efecto del ácido maslínico y derivados en la actividad enzimática de la COX-2 en monocitos de sangre periférica.
- 25 ■ Se ha determinado el efecto del ácido maslínico y derivados sobre la formación de isoprostranos en monocitos primarios humanos de sangre periférica.
- Se ha determinado el efecto del ácido maslínico y derivados sobre la liberación de PGE<sub>2</sub> en condrocitos primarios humanos.
- 30 ■ Se ha determinado el efecto del ácido maslínico y derivados sobre la liberación de PGE<sub>2</sub> en astrocitos de rata primarios y en la línea celular de tipo neuroblastoma SK-S-NH.
- 35 ■ Se ha determinado el efecto del ácido maslínico y derivados sobre la regulación transcripcional del gen *COX-2* y sobre la expresión de la proteína COX-2 en astrocitos primarios.
- 40 ■ Se han realizado pruebas clínicas sobre pacientes afectados por procesos atróficos artrósicos, artríticos, fibromiálgicos o tendinosos, entre otros, para probar la eficacia del tratamiento “*in vivo*” y muy especialmente por administración tópica.

45 Es preciso tener en cuenta que, a veces, los diagnósticos que previamente tenían realizados los pacientes tratados, no son muy precisos, siendo en muchas ocasiones la sintomatología el único medio empleado para el antedicho diagnóstico.

Ya que la funcionalidad de COX-2 y la producción de PGE<sub>2</sub> se regula a varios niveles y que el ácido maslínico inhibe la producción de PGE<sub>2</sub> en monocitos primarios humanos se ha estudiado en detalle el efecto de este triterpeno sobre la expresión y función de la COX-2 en diferentes tipos celulares “*in vitro*” como paso previo a los estudios con modelos animales específicos. Así, se ha demostrado por primera vez la acción “*in vitro*” del ácido maslínico en la inhibición de COX-2 inducida en condrocitos humanos y se ha llevado a cabo un amplio estudio clínico de pacientes con artrosis, artritis o fibromiálgias, entre otros, pudiendo demostrar una sorprendente eficacia del ácido maslínico y sus sales incluso en tratamientos tópicos sencillos de las zonas que presentaban estos síndromes. De hecho, aunque en todos los pacientes con artrosis se observó una mejoría de los síntomas, en aquellos menores de aproximadamente 60 años los síntomas remitieron totalmente en menos de un mes de tratamiento. Además, en todos los casos, se observa  
55 de forma muy sintomática la paulatina reabsorción de calcificaciones propias de los síndromes artrósicos.

En más del 80% de los casos la eficacia en lo que a sintomatología se refiere se comienza a notar en 24/48 horas y entre 2 a 6 aplicaciones tópicas. Además de la mejora de la sintomatología en articulaciones (dolor y rigidez) los pacientes con inflamación evidente, por ejemplo en los dedos de la mano, notan en pocos minutos un aumento de temperatura en las zonas tratadas, lo que indica claramente el aumento de circulación sanguínea que el paciente empieza a experimentar en forma inmediata.

Se ha comprobado, que el ácido maslínico es un potente inmunomodulador de la respuesta inmune ya que inhibe la activación y la proliferación de los linfocitos T estimulados vía TCR e inhibe la producción de las citoquinas pro-inflamatorias TNF $\alpha$  e IL-6, además de la producción de la Prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) en monocitos primarios. Además, se observa que las concentraciones de ácido maslínico que actúan inhibiendo las respuestas inmunes innata y adquirida son sensiblemente más bajas que las requeridas para inducir apoptosis en líneas celulares tumorales.

## ES 2 328 999 B1

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

1. El ácido maslínico inhibe la producción de PGE<sub>2</sub> en monocitos humanos.
2. El ácido maslínico inhibe la actividad enzimática de la COX-2.
3. El ácido maslínico no inhibe ni la activación transcripcional del promotor del gen de la COX-2 ni la expresión de la proteína.
4. El ácido maslínico a dosis altas inhibe la producción de PGE<sub>2</sub> en condrocitos y en células derivadas de un neuroblastoma.
5. El ácido maslínico inhibe la producción de isoprostranos en monocitos humanos.
6. El ácido maslínico inhibe la producción de IL-6 en monocitos y condrocitos humanos.
7. La inhibición de producción de IL-6 por el MA no se debe a una inhibición transcripcional del gen de la IL-6.

Hay que tener en cuenta que, las uniones entre los huesos están recubiertas por el cartílago articular, un tejido que no contiene capilares ni terminaciones nerviosas. Durante el movimiento articular la fricción entre huesos se minimiza por este cartílago articular, que contiene condrocitos, los cuales representan el 1-2% del volumen total, y cuya función es sintetizar proteínas de la matriz extracelular. Esta matriz contiene un 70-80% de agua lo que le permite tener una estructura que sirve para amortiguar las presiones. La interacción electrostática entre las moléculas de agua y los mucopolisacáridos sulfatados es necesaria para mantener la hidratación del cartílago. Por tanto los proteoglicanos lubricados por los polímeros de hialurónico es la sustancia que mantiene la integridad del cartílago. Los glucosaminoglicanos y proteoglicanos mantienen una íntima relación con las fibras de colágeno producidas por los condrocitos, los cuales también producen los proteoglicanos.

Por todo ello, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso del ácido maslínico, en su definición más amplia como anteriormente se ha descrito, o cualquiera de sus derivados para la preparación de un medicamento para el tratamiento de patologías relacionadas con la activación de la COX-2.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del ácido maslínico o cualquiera de sus derivados para preparar un medicamento que además favorece la regeneración tisular condrocitaria.

En una realización preferida de la invención las patologías relacionadas con la activación de la COX-2 y/o en las que se produce regeneración tisular condrocitaria se seleccionan de la lista que comprende: artrosis, artritis reumatoides, ciática, fibromialgias, *hallux valgus* o protuberancia de la articulación metatarsofalángica (juanete), tendinitis rotuliana (rodilla del saltador) u otras patologías que responden a AINES específicos para COX-2. Una realización aún más preferida comprende su uso para el tratamiento de artrosis o artritis reumatoide.

Otro aspecto de la presente invención, se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácido maslínico en su definición más amplia (sales, metabolitos, extractos de plantas que lo contengan, extracto de los subproductos de procesado industrial de la planta o sus frutos, o un subproducto industrial o una combinación de cualquiera de estos componentes) o cualquiera de sus derivados para el tratamiento de enfermedades que cursen con la activación de la COX-2. Más concretamente útil para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la activación de la enzima COX-2 en condrocitos de humanos o animales mediante la inhibición de esta COX-2.

En una realización preferida, dicha composición además comprende ácido oleanólico y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable. Más preferidamente, la relación de ácido maslínico:ácido oleanólico es de entre 2:1 y 6:1.

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. Más particularmente, el ácido maslínico o la mezcla de ácido maslínico y ácido oleanólico, se encuentra en una proporción de entre 0.5 y 10% del total de la composición, más concretamente entre el 0.5 y el 5% y aún más concretamente entre el 1 y el 3%.

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

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

## ES 2 328 999 B1

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. Mas preferiblemente en forma de solución, emulsión, crema, leche corporal o ungüento.

En otra realización preferida, esta composición contiene ácido maslínico o cualquiera de sus derivados, obtenidos de un extracto de planta del genero Olea o de un subproducto industrial de planta del genero Olea.

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 dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Breve descripción de las figuras

Fig. 1.- Muestra el efecto del ácido maslínico sobre la producción de PGE-2 en monolitos humanos.

Fig. 2.- Muestra el efecto del ácido maslínico sobre la expresión de COX-2 en monolitos humanos.

Fig. 3.- Muestra el efecto del ácido maslínico sobre la actividad de COX-2 en monolitos humanos.

Fig. 4.- Muestra el efecto del ácido maslínico sobre la producción de PGE-2 en células SK-N-SH

Fig. 5.- Muestra el efecto del ácido maslínico sobre la producción de PGE-2 en astrocitos primarios.

Fig. 6.- Muestra el efecto del ácido maslínico sobre la actividad transcripcional de la COX-2.

Fig. 7.- Muestra el efecto del ácido maslínico sobre la expresión de la COX-2 en monocitos humanos.

Fig. 8.- Muestra el efecto del ácido maslínico sobre la producción de PGE-2 en condrocitos.

Fig. 9.- Muestra el efecto del ácido maslínico sobre la producción de IL-6 en condrocitos.

Fig. 10.- Muestra el efecto del ácido maslínico sobre la producción de PGE-2 en monolitos.

Fig. 11.- Muestra el efecto del ácido maslínico sobre la actividad del promotor de la IL-6 inducida por P+I.

Fig. 12.- Muestra el efecto del ácido maslínico sobre la actividad del promotor de la IL-6 inducida por IL-1.

Fig. 13.- Muestra el efecto del ácido maslínico sobre la producción de isoprostanos en monolitos primarios.

### Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto, entre otras cosas, 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 compuestos, materiales y métodos utilizados:

#### 1. Compuestos

Se utilizó ácido maslínico en su forma de sal sódica, la cual se disolvió en DMSO (dimetilsulfóxido) en una solución stock (10 y 50 mM). La concentración máxima final de DMSO en los cultivos fue del 1% (vol/vol), la cual no interfiere con los parámetros medidos.

## ES 2 328 999 B1

### 2. Cultivos celulares

- 5     ▪ Aislamiento y cultivo de monocitos primarios de sangre periférica. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes de donantes voluntarios sanos y adultos, fueron aisladas por centrifugación de sangre venosa mediante gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque. Los monocitos fueron separados mediante adherencia al plástico y posteriormente cultivados en placas de 24 pozos a una densidad de 500.000 células/ml para los experimentos de enzoinmunoensayos (EIA) y en placas de 6 pozos para los ensayos de inmunoblot.
- 10    ▪ Cultivo de condrocitos primarios humanos. Los condrocitos fueron comprados a Promocell (Heidelberg, Alemania) y cultivados en medio condicionado para este tipo de células. Las células fueron cultivadas en placas de 24 pozos para la determinación de PGE<sub>2</sub> e IL-6.
- 15    ▪ Cultivo de astrocitos primarios de rata. Los cultivos primarios de astrocitos fueron preparados a partir de cerebros de rata neonatal (1 día de vida). La parte superior del cráneo fue abierta y las meninges cuidadosamente separadas para evitar la contaminación de los cultivos con fibroblastos. La corteza cerebral se aisló y se obtuvo una suspensión celular que se cultivó en DMEM condicionado para cultivo de astrocitos. Los cultivos fueron expandidos en placas de 6 pozos y la producción de PGE<sub>2</sub> medida en células después del 3 o 20    4 pase.
- 25    ▪ Cultivo de líneas celulares. La SK-N-SH (*American Tissue Culture collection, HTB 11*) es una línea celular derivada de un neuroblastoma humano y se mantuvo en crecimiento exponencial en DMEM suplementado con 2 mmol/l L-glutamina, antibióticos y 10% de FCS. Las células fueron cultivadas a 37°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3. Western blots

30    Las células (monocitos primarios o SK-N-SH) fueron estimuladas como se indica en cada caso y lisadas en 50  $\mu$ l de solución de lisado (20 mM Hepes pH 8.0, 10 mM KCl, 0.15 mM EGTA, 0.15 mM EDTA, 0.5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mM NaF, 1 mM DTT, leupeptina 1  $\mu$ g/ml, pepstatina 0.5  $\mu$ g/ml, aprotinina 0.5  $\mu$ g/ml, 1 mM PMSF y 0.5% NP-40). La concentración de proteínas fue determinada mediante el reactivo de Bradford (Bio-Rad, Richmond, CA, EEUU) y 30  $\mu$ g de proteínas fueron hervidos en solución Laemmli y sometidos a electroforesis en gel de SDS/poliacrilamida al 10%. 35    Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (0.5 A, 100V a 4°C) durante 1 h. Las membranas fueron bloqueadas en TBS conteniendo 0.1% de Tween 20 y 5% de leche en polvo desnatada. La inmunodetección de las distintas proteínas fue llevada a cabo mediante incubación con los distintos anticuerpos primarios durante dos horas, seguido de incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa durante una hora y media y revelado mediante el uso del sistema de quimioluminiscencia ECL (GE Healthcare Life 40    Sciences).

### 4. Transfecciones transitorias y ensayos de luciferasa

45    Las células SK-N-SH fueron transfectadas con los plásmidos COX-2-Luc e IL-6-Luc usando el reactivo Jet Pei (Polyplus transfection, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Ambos plásmidos contienen los promotores de los genes indicados dirigiendo el gen de la luciferasa como marcador de la activación transcripcional. Las células se mantuvieron en cultivo en condiciones normales hasta 24 ó 48 horas después de la transfección dependiendo del experimento y se estimularon de la manera indicada en cada caso. Tras los estímulos, las células fueron lisadas en 50    tampón de lisado (25 mM Tris-fosfato pH 7.8, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, y 7% glicerol) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La actividad luciferasa en el extracto de proteínas fue determinada mediante el uso del luminómetro Autolumat LB9510 (Berthold) siguiendo las instrucciones del sistema Luciferase assay de Promega (Madison, WI, USA).

### 55    5. Determinación de la producción de PGE<sub>2</sub> en distintos tipos celulares y de la actividad COX-2

60    Los cultivos de condrocitos, monocitos y astrocitos fueron estimulados con los correspondientes activadores (IL-1, LPS o PMA más Ionomicina) en presencia o no de varias concentraciones de ácido maslínico durante los tiempos indicados. Posteriormente los sobrenadantes fueron recogidos para determinar la cantidad de PGE<sub>2</sub> liberada por las células estimuladas. La PGE<sub>2</sub> fue determinada usando el sistema EIA de Assay Designs (numero de catalogo 901-001) siguiendo las instrucciones del fabricante.

65    Para la determinación de la actividad COX-2, las células se estimularon primero con LPS (10 ng/ml) durante 24 h para inducir la expresión celular de la proteína COX-2. Pasado este tiempo los cultivos fueron lavados y se añadió nuevo medio de cultivo libre de suero, ácido maslínico (diferentes concentraciones) y ácido araquidónico (AA) durante 15 min. En este tiempo la actividad enzimática de COX-2 se mide por su capacidad de producir PGE<sub>2</sub> a partir del AA incluido en el cultivo.

## ES 2 328 999 B1

### 6. Determinación de la producción de Isoprostanos e IL-6 en monocitos

Los cultivos de monocitos fueron estimulados igual que para la producción de PGE<sub>2</sub> (estimulación con LPS durante 24 h) y la cantidad de 8-*iso*-prostaglandina F<sub>2α</sub> (isoprostanos) o IL-6 liberada por las células fue determinada respectivamente mediante los sistemas de EIA de Cayman (USA) (numero de catalogo 516351) o de Pelikine (numero de catalogo RDI-M1916clb) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

#### Ejemplo 1

*El ácido maslínico (MA) inhibe la actividad enzimática de la enzima COX-2 y la producción de PGE<sub>2</sub> en monocitos estimulados con LPS*

En los procesos inflamatorios los monocitos producen numerosas citoquinas pro-inflamatorias como el TNF $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y la IL-6 y mediadores de la inflamación como los leucotrienos y las prostaglandinas entre otros. Ya se demostró con anterioridad que el ácido maslínico (MA) inhibió la producción de PGE<sub>2</sub> en monocitos humanos obtenidos de sangre de periférica y estimulados con LPS (Fig 1).

Con el fin de identificar el mecanismo de acción del MA sobre la producción de PGE<sub>2</sub>, aspecto de gran importancia para buscar la causa y poder predecir aplicaciones, se realizaron una serie de experimentos destinados a estudiar el efecto del MA sobre la actividad transcripcional del gen de la COX-2 y sobre la expresión de la proteína. En primer lugar monocitos de sangre periférica se estimularon con LPS en presencia de dosis crecientes de MA y 12 horas después se extrajeron las proteínas celulares que fueron sometidas a electroforesis para detectar la expresión de COX-2 mediante western blots. En la figura 2 se puede observar que el MA no inhibió la expresión de COX-2 inducida por LPS. (Fig.2).

Ante la posibilidad del que el MA actuase como inhibidor de la actividad COX-2, indujimos la expresión de COX-2 mediante tratamiento de los monocitos con LPS durante 24 h. Pasado este tiempo las células fueron lavadas tres veces con medio sin suero e incubadas durante 15 min con dosis crecientes de MA. Pasado este tiempo, se añadió ácido araquidónico a los cultivos (15  $\mu$ M) durante otros 15 min y la conversión a PGE<sub>2</sub> medida mediante EIA. En la figura 3 se puede observar que el MA inhibió de forma dosis dependiente la actividad enzimática de COX-2 y explica su efecto sobre la producción de PGE<sub>2</sub> en este tipo celular. (Fig 3).

#### Ejemplo 2

*Efecto dual del ácido maslínico (MA) sobre la producción de PGE<sub>2</sub> en astrocitos primarios y en la línea celular SK-N-SH (neuroblastoma)*

A continuación se estudió el efecto del MA sobre la actividad transcripcional del promotor del gen de la COX-2 y sobre la expresión de la proteína en células SK-N-SH. Estas células fueron transfectadas de forma transitoria con un plásmido que contiene el gen de la luciferasa dirigido por el promotor completo del gen COX-2. 24 h después de la transfección las células se incubaron con dosis crecientes de MA y se estimularon con PMA más Ionomicina durante 6 horas. Pasado este tiempo la actividad luciferasa fue medida en los lisados celulares observándose que el MA no afectó a la actividad transcripcional del gen COX-2 (Fig.5).

La expresión inducible de la proteína COX-2 tampoco se vio afectada en células SK-N-SH por la presencia de MA (Fig 6).

#### Ejemplo 3

*Efecto del ácido maslínico (MA) sobre la producción de PGE<sub>2</sub> e IL-6 en condrocitos humanos estimulados con IL-1*

Para determinar si el efecto del MA sobre la producción de PGE<sub>2</sub> también ocurría en otro tipo celular involucrado en fenómenos inflamatorios se ha determinado la actividad anti-inflamatoria del ácido maslínico sobre condrocitos primarios humanos. Las células fueron tratadas con dosis crecientes de MA y posteriormente estimuladas con IL-1 (10 U/ml) para determinar la liberación de PGE<sub>2</sub> e IL-6. En la figura 7 (Fig.7) se muestra que el MA ejerce un efecto dual en la producción de PGE<sub>2</sub> tras la estimulación con IL-1 en condrocitos. A dosis mas bajas (0.1 y 1  $\mu$ g/ml) se produjo un incremento de la producción de PGE<sub>2</sub>, mientras que dosis más altas (25 y 50  $\mu$ g/ml) se observó una completa inhibición de liberación de esta prostraglandina inducida por la IL-1.

Por el contrario la producción de IL-6 fue completamente inhibida por el MA en las mismas células y de una manera dependiente de la concentración (Fig. 8).

Estos resultados concuerdan totalmente con los resultados encontrados previamente en monocitos humanos donde la IL-6 inducida por LPS fue inhibida por el MA (Fig. 9).



## ES 2 328 999 B1

A continuación se estudió si el efecto inhibitorio del ácido maslínico sobre la liberación de IL-6 era debido a un efecto transcripcional sobre el gen que codifica dicha proteína. Así, las células SK-N-SH, que son productoras de IL-6, fueron transfectadas con un plásmido que contiene el gen de la luciferasa dirigido por el promotor completo de la IL-6 y estimuladas con IL-1 o una combinación de PMA mas ionomicina en presencia o ausencia de dosis crecientes de MA y la actividad luciferasa medida en los extractos celulares después de 4 horas de tratamiento. En las figuras 10 y 11 (Fig. 10 y 11) se muestra que el MA no inhibe la actividad transcripcional del promotor de la IL-1, por lo que actividad inhibitoria sobre la liberación de IL-6 es debida seguramente a una inhibición a nivel post-transcripcional.

### 10 Ejemplo 4

*Efecto del ácido maslínico (MA) sobre la producción de isoprostanos en monocitos humanos estimulados con LPS*

15 Los isoprostanos como el endoperoxido 8-iso-prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (8-iso-PGF $_{2\alpha}$ ) son metabolitos de la oxidación de ácido araquidónico y en la actualidad se considera unos de los mejores marcadores del estrés oxidativo. En la figura 12 (Fig.12) se muestra que el MA inhibe de forma concentración dependiente la liberación de 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  producida en monocitos humanos se sangre periférica tras la estimulación con LPS. Este dato confirma la actividad anti-oxidante del MA demostrada previamente por otros autores. La potencia inhibitoria del MA sobre la producción de isoprostanos es superior a la del tocoferol y el trolox y es comparable a la del resveratrol (Fig.13).

20

### Ejemplo 5

25 Se realizaron pruebas clínicas mediante la administración por vía tópica de sal sódica del ácido maslínico y mezclas, en proporciones variables, de las sales sódicas de ácido maslínico y ácido oleanólico y de ácido maslínico y ácido oleanólico en proporciones variables (de entre 70% y el 85% de maslínico y entre el 30% y el 15% de oleanólico). En el caso de utilización de sales, la administración por vía tópica se ha realizado debidamente distribuida en una leche corporal tipo y en el caso de los ácidos libres se utilizado la conocida base Beeler para su administración. La leche corporal contenía aproximadamente de entre el 0.5% al 1.5% de principio activo (sales) y la crema contenía 30 aproximadamente entre el 1.5% al 2,5% del principio activo (ácidos libres) así como de extractos de residuos de la molturación de aceituna enriquecidos en ácido oleanólico y ácido maslínico.

Las sales sódicas se obtuvieron por tratamientos básicos con MeONa en metanol o con disoluciones acuosas de NaOH siguiendo los procedimientos usuales de laboratorio.

35

Algunos de los resultados obtenidos por tratamientos tópicos se muestran en la tabla I:

40 TABLA I

ZONA	SEXO	EDAD	DIAGNOSTICO	RESULTADO	OBSERVACIONES
RODILLAS	Varón	61	ARTROSIS	POSITIVO	
DEDOS	V	61	ARTROSIS	POSITIVO	
COLUMNA	V	61	ARTROSIS	POSITIVO	
HOMBRO	V	80	ARTROSIS	POSITIVO	PERMANENTE
MUÑECAS	Hembra	50	ARTROSIS	POSITIVO	PERMANENTE
COLUMNA	V	50	ARTROSIS	POSITIVO	

55

60

65

ES 2 328 999 B1

	RODILLAS	H	58	ARTROSIS	POSITIVO	
	C. FEMUR	V	55	ARTROSIS	POSITIVO	
5	DEDOS	H	55	ARTROSIS	POSITIVO	
	DEDOS	H	40	ARTROSIS	POSITIVO	
	RODILLAS	V	52	ARTROSIS	POSITIVO	PERMANENTE
	HOMBRO	V	53	ARTROSIS	POSITIVO	
10	CIATICA	H	51	CIATICA	POSITIVO	PERMANENTE
	HOMBRO	V	64	ARTROSIS	POSITIVO	
	COCCIX	H	50	ARTROSIS	POSITIVO	
15	COLUMNA	H	53	CIATICA	POSITIVO	
	HOMBRO	H	92	ARTROSIS	POSITIVO	
	DEDOS	V	65	ARTROSIS	POSITIVO	
	PIES	H	61	ARTROSIS	POSITIVO	
20	RODILLAS	H	63	ARTROSIS	NEGATIVO	
	HOMBRO	V	63	ARTROSIS	POSITIVO	
	DEDOS	H	75	ARTROSIS	POSITIVO	
25	COLUMNA	H	52	ARTROSIS	POSITIVO	
	DEDOS	H	65	ARTROSIS	POSITIVO	
	RODILLAS	V	54	ARTROSIS	POSITIVO	
	COLUMNA	V	54	ARTROSIS	POSITIVO	
30	CIATICA	V	54	CIATICA	POSITIVO	PERMANENTE
	DEDOS	H	63	ARTROSIS	POSITIVO	
	DEDOS	H	52	ARTROSIS	POSITIVO	
35	RODILLAS	H	63	ARTROSIS	POSITIVO	
	DOLORES GENERALIZADOS	H	52	FIBROMIALGIA	POSITIVO	
40	DOLORES GENERALIZADOS	H	54	FIBROMIALGIA	POSITIVO	
	DOLORES GENERALIZADOS	H	48	FIBROMIALGIA	POSITIVO	
45	DOLORES GENERALIZADOS	H	55	FIBROMIALGIA	POSITIVO	
	PIES	H	63	METATARSOFA LANGICA (JUANETE)	POSITIVO	
50	RODILLAS	V	86	ARTROSIS	NEGATIVO	
	COLUMNA	H	67	ARTROSIS LUMBAR	POSITIVO	
55	DEDOS	H	48	ARTROSIS	POSITIVO	
	RODILLAS	V	61	SINDROME DEL SALTADOR	POSITIVO	
60	RODILLAS	V	50	SINDROME DEL SALTADOR	POSITIVO	
	DEDOS	H	48	ARTROSIS	POSITIVO	
	DEDOS	H	35	ARTROSIS	POSITIVO	
65	C. FEMUR	V	54	ARTROSIS	POSITIVO	PERMANENTE

## ES 2 328 999 B1

Resultado positivo significa disminución significativa de las molestias y aumento considerable de la flexibilidad de la articulación, dejando transcurrir entre 12 y 24 horas hasta el siguiente tratamiento tópico, lo que demuestra un efecto antiinflamatorio eficaz en la zona cartilaginosa. En algunos de los casos, la eliminación de síntomas ha sido permanente, lo que demuestra un proceso de regeneración condrocitaria. Es sorprendente que, en lo que a sintomatología se refiere se ha logrado en muchas ocasiones desde la primera aplicación.

De entre muchos más de un centenar de pacientes, se localizaron únicamente dos resultados catalogados como “negativos” que se evaluaron específicamente, el primero es una mujer de 60 años con un historial de más de 20 años de artrosis en rodillas y pies, al cabo de dos meses de tratamiento admitió una apreciable mejoría en las molestias de los pies. El segundo se trata de un hombre mayor de 85 años y con graves molestias de rodillas que no reconoció mejoría en el tratamiento.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 328 999 B1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso del ácido maslínico o cualquiera de sus derivados para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de patologías que cursen con la activación de la COX-2.
2. Uso del ácido maslínico o cualquiera de sus derivados para la elaboración de un medicamento para la regeneración tisular condrocitaria.
- 10 3. Uso del ácido maslínico o cualquiera de sus derivados según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de patologías seleccionadas de la lista que comprende: artrosis, artritis reumatoides, ciática, fibromialgias, tendinitis rotuliana o juanete.
- 15 4. Composición farmacéutica que comprende ácido maslínico o cualquiera de sus derivados para el tratamiento de enfermedades que cursen con la activación de la COX-2.
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5 que además comprende ácido oleanólico.
7. Composición según reivindicación 6 donde la relación entre el ácido maslínico y el ácido oleanólico es de entre 2:1 y 6:1.
- 25 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 4-7 en una forma adaptada a la administración tópica.
9. Composición según reivindicaciones 4 a 8, donde el ácido maslínico o cualquiera de sus derivados se obtiene de un extracto de planta del género Olea.
- 30 10. Composición según reivindicaciones 4 a 9, donde el ácido maslínico o cualquiera de sus derivados se obtiene de un subproducto industrial de planta del género Olea.
- 35 11. Composición según reivindicaciones 4 a 9, donde el ácido maslínico o cualquiera de sus derivados se encuentran en una proporción de entre el 0,5% y el 3% del total de la composición.

35

40

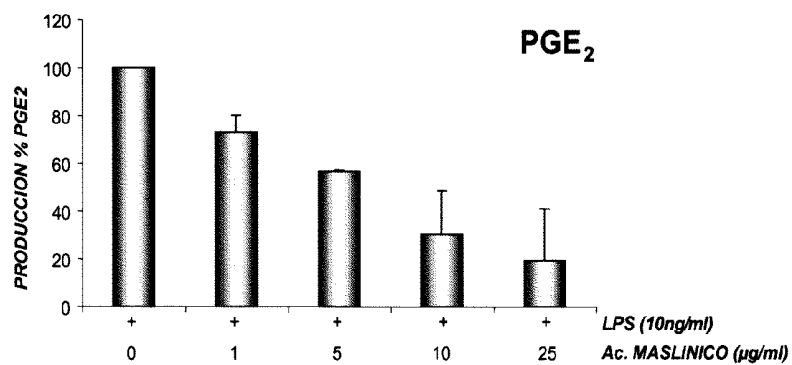
45

50

55

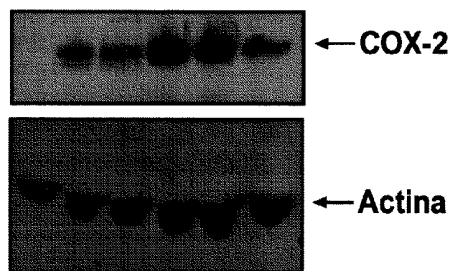
60

65

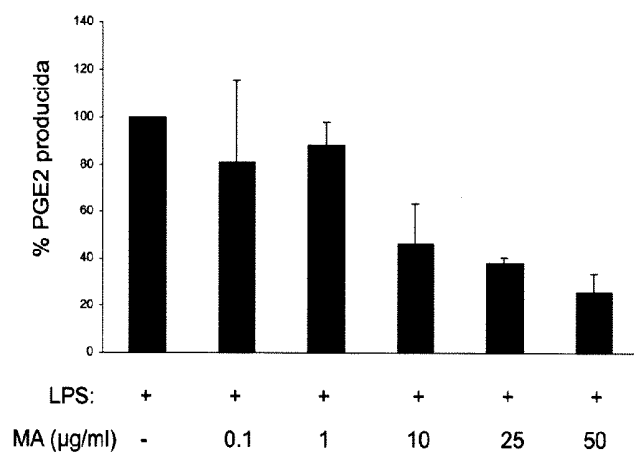


**FIG. 1**

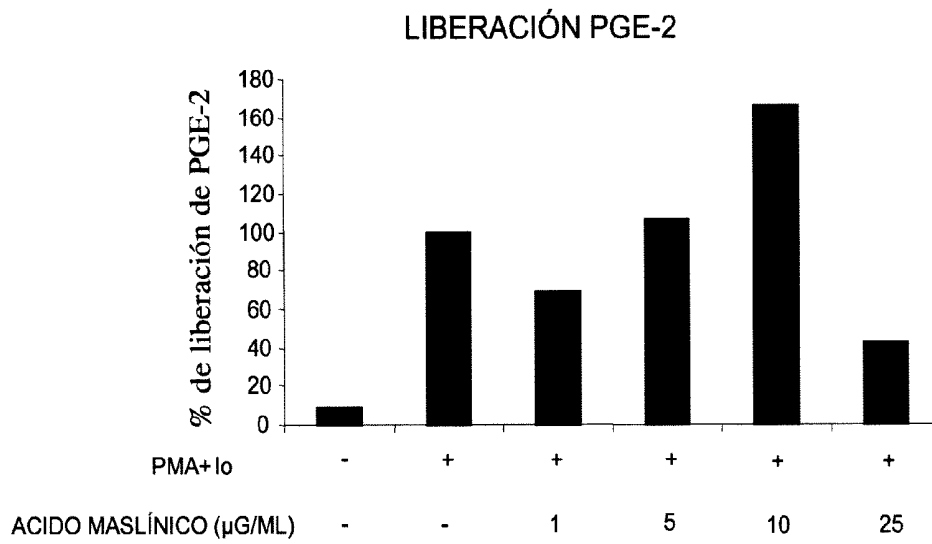
LPS: - + + + + + (10 ng/ml)  
 MA: - - 1 10 25 50 (µg/ml)



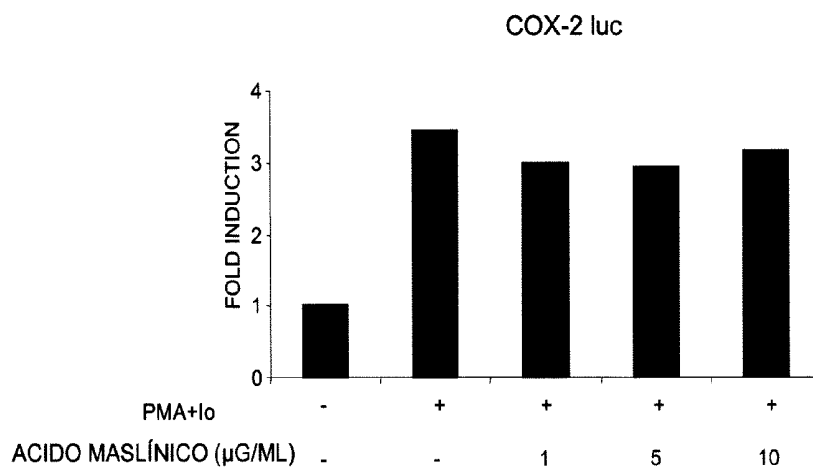
**FIG.2**



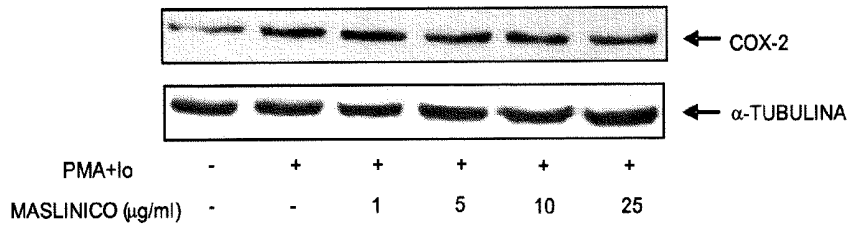
**FIG. 3**



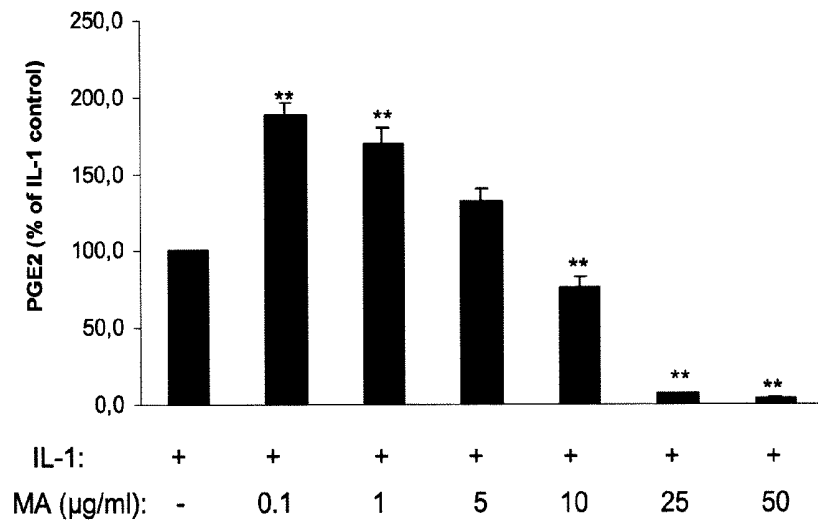
**FIG. 4**



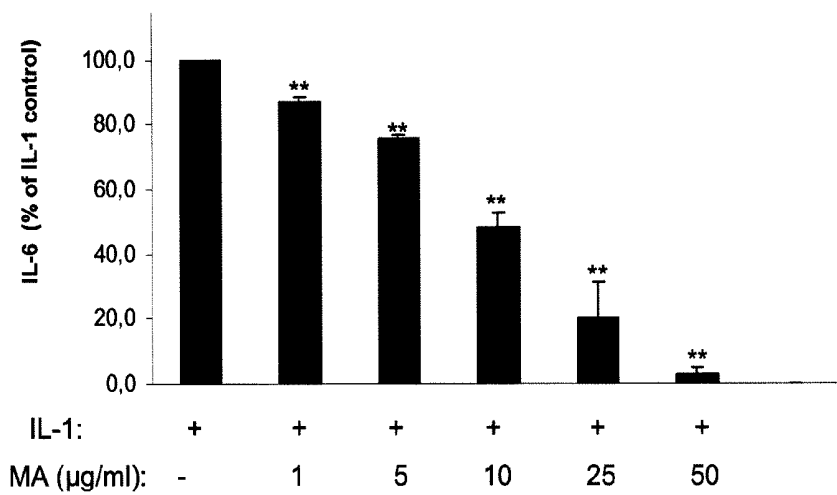
**FIG. 5**



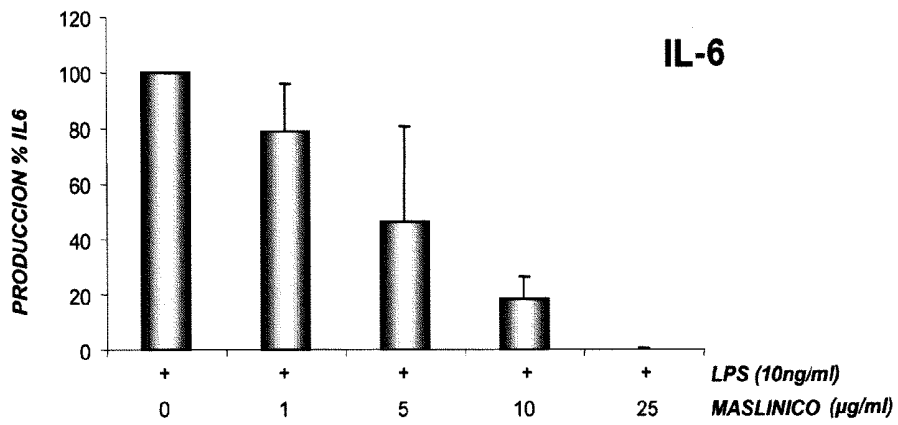
**FIG. 6**



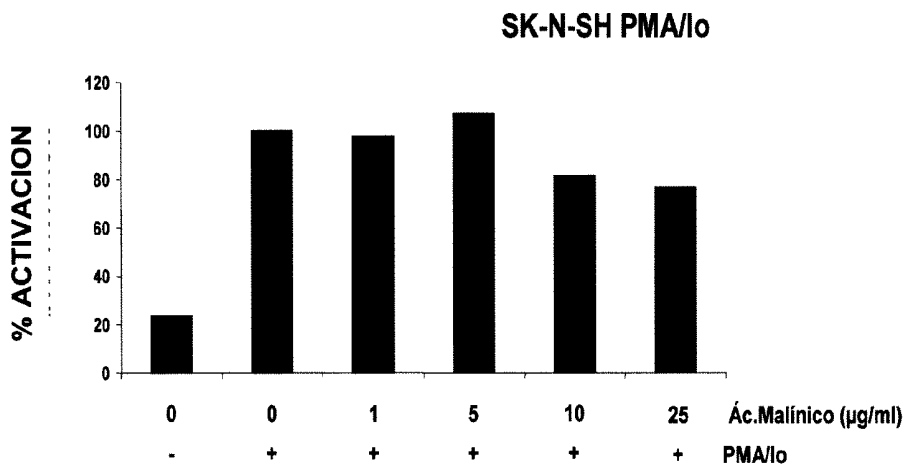
**FIG. 7**



**FIG. 8**

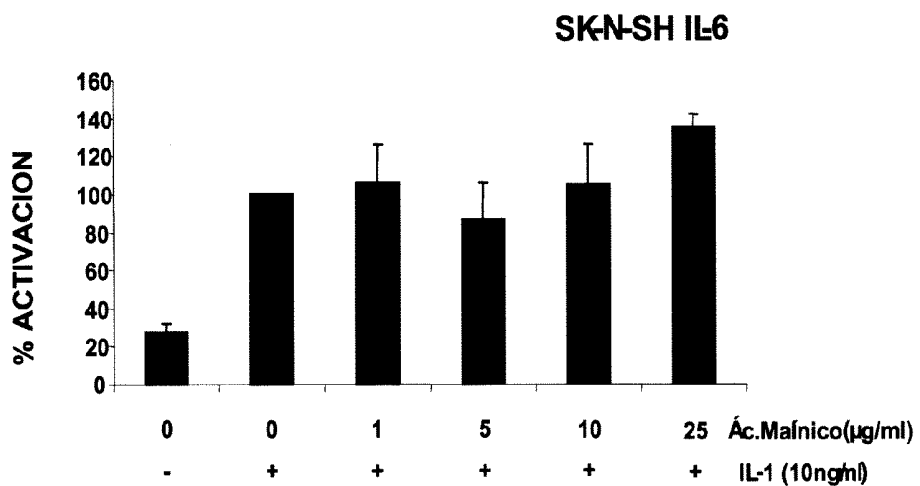


**FIG. 9**

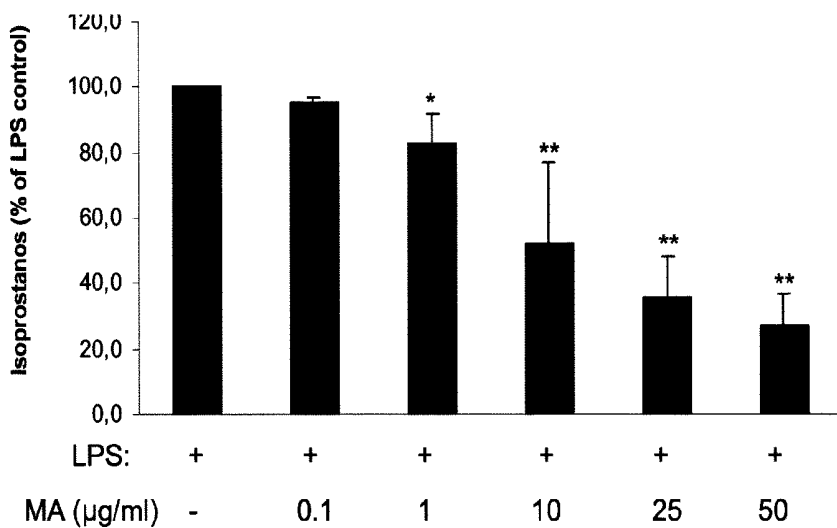


**FIG. 10**





**FIG.11**



**FIG.12**

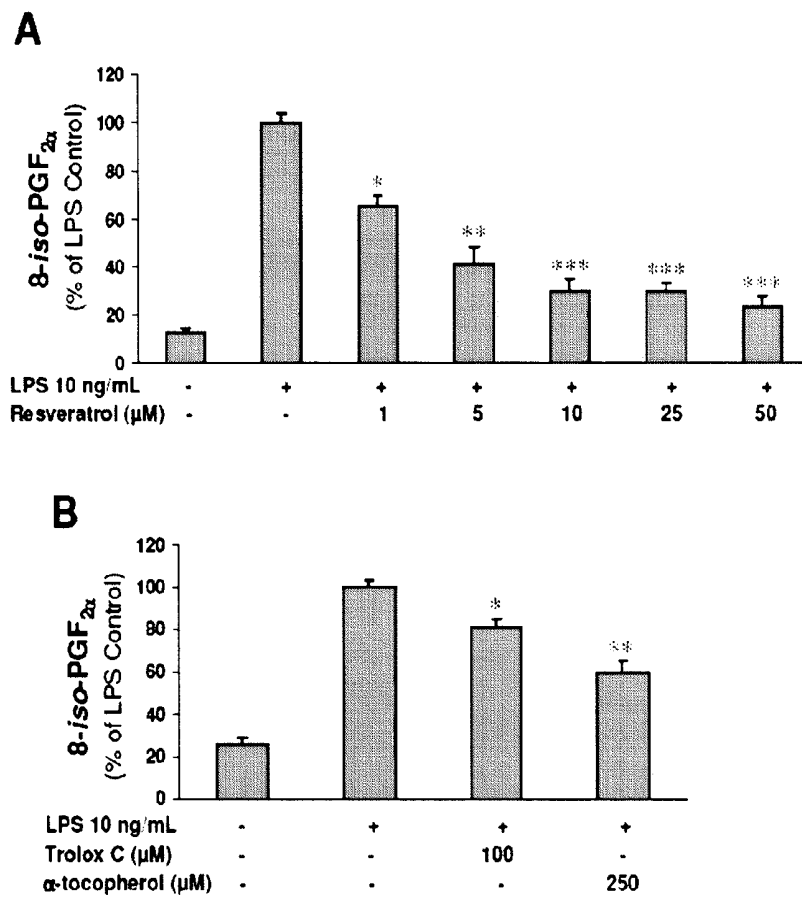


FIG.13



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 328 999

② Nº de solicitud: 200801069

② Fecha de presentación de la solicitud: **03.04.2008**

③ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 31/56** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ 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	MARQUEZ.-MARTIN, A et al. "Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells". Cytokine, 2006, vol. 36, páginas 211-217, páginas 211,212,216 (primera columna, último párrafo).	1-3
X	MARQUEZ.-MARTIN, A et al.: "Efecto antiinflamatorio de compuestos triterpénicos presentes en la fracción insaponificable del aceite de orujo de oliva". Nutrición Hospitalaria, 2005 vol. 20, supl. 1, marzo, todo el documento.	1-3

#### 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

30.10.2009

Examinador

H. Aylagas Cancio

Página

1/4

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

A61K, A61P

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.10.2009

**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	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-11	<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	Cytokine, vol. 36, páginas 211-217.	2006
D04	Nutrición Hospitalaria, vol. 20, supl. 1, marzo	2005

**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 y de sus derivados para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de patologías que cursen con la activación de la ciclooxigenasa 2, para la regeneración tisular condrocitaria y en específicamente para patología como la artrosis, artritis reumatoidea, ciática, fibromialgias, tendinitis rotuliana o juanetes. Así mismo se refiere a la composición farmacéutica que comprende al 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).

A la vista de los documentos D1 y D2, las reivindicaciones 4-11 que se refieren a composiciones farmacéuticas que contiene 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.

Los documentos D3 y D4 describen el efecto antiinflamatorio de compuestos triterpénicos presentes en la fracción insaponificable del aceite de orujo de oliva: ácido maslínico, ácido oleanólico, eritrodiol y uvaol. Se estudia la modulación de la secreción de citoquinas, que son glicoproteínas solubles con una papel en la regulación de los procesos inflamatorios (documento D3) y la determinación de mediadores implicados en la inflamación tales como óxido nítrico y prostaglandina E2 (documento D4). En este último documento se concluye que estos compuestos triterpénicos y la fracción insaponificable del aceite de orujo de oliva, tienen un efecto antiinflamatorio, así como la importancia que este alimento funcional puede tener en enfermedades tales como la aterosclerosis o la artrosis reumatoide.

Las reivindicaciones 1-3 hacen referencia al uso del ácido maslínico en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de patologías que cursen con la activación del COX-2 (Reiv. 1), en la regeneración tisular condrocitaria (Reiv. 2) y al tratamiento específico de patologías tales como artrosis, artritis reumatoidea, ciática, fibromialgias, tendinitis rotuliana o juanetes (Reiv.3).

Si bien la descripción de la invención muestra el alivio sintomático observado para ciertas dolencias inflamatorias, no existe un efecto probado en lo referente a los procesos de regeneración tisular condrocitaria, solo la referencia a que dicho proceso depende de la eliminación permanente de los síntomas inflamatorios (página 20, líneas 5-11 de la solicitud).

En consecuencia y dado que se conocen los efectos antiinflamatorios del ácido maslínico (ver documentos D3 y D4) no es posible reconocer actividad inventiva al objeto de las reivindicaciones 1-3 de la solicitud (Artículo 8.1 de la ley de Patentes 11/1986).