



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 140 329**

② Número de solicitud: 009702528

⑤ Int. Cl.⁶: A61K 31/19

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **04.12.1997**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2000**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.02.2000

⑦ Solicitante/s: **UNIVERSIDAD DE GRANADA**
Acera de San Ildelfonso, 42
18071 Granada, ES

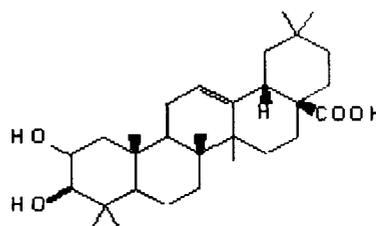
⑦ Inventor/es: **Rivas García, Francisco;**
Osuna Carrillo de Albornoz, Antonio;
Mascaro Lazcano, M. Carmen y
Nájera Morrondo, Rafael

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Utilización de ácido maslínico como inhibidor de proteasas para el tratamiento de la enfermedad causada por los virus de la inmunodeficiencia adquirida.**

⑤ Resumen:

Utilización de ácido maslínico como inhibidor de serín proteasas para el tratamiento de enfermedades causadas por el virus de inmunodeficiencia adquirida. El ácido 2-alfa,3-betadihidroxi-28-carboxioleaneno (ácido maslínico) se utiliza, sólo o en combinación con otros fármacos, para la obtención de preparados destinados al tratamiento de las enfermedades causadas en humanos y animales por el virus de inmunodeficiencia adquirida.



ES 2 140 329 A1

DESCRIPCION

Utilización de ácido maslínico como inhibidor de proteasas para el tratamiento de la enfermedad causada por los virus de la inmunodeficiencia adquirida.

5 **Objeto de la invención.**

El tratamiento de las enfermedades causadas por los virus de inmunodeficiencia adquirida (HIV) es hoy un reto para los científicos. Estos retrovirus RNA portan en su cápside enzimas proteolíticas para interaccionar con las proteínas de membrana de la célula huesped. El objeto de la invención es la utilización, bien en forma aislada o en combinación con fármacos complementarios o sinérgicos, de inhibidores de las proteasas del virus (concretamente de las serín proteasas), para la obtención de preparados terapéuticos destinados al tratamiento preventivo, limitativo o curativo de las afecciones por HIV. El empleo con fines terapéuticos de inhibidores de serín-proteasas es extensivo a todos aquellos agentes infecciosos que empleen estas enzimas en su proceso invasivo.

15 **Estado de la técnica.**

La terapia frente a HIV se basa actualmente en tres tipos de agentes, aislados o en combinación: análogos de nucleósidos, inhibidores de la transcriptasa inversa, e inhibidores de la proteasa. Esta última es un componente esencial en el ciclo replicativo de los virus HIV. Su inhibición conduce a progenies virales no infecciosas, por lo que previene la expansión de la infección. Estructuralmente la proteasa (o proteinasa) es un homodímero de dos cadenas iguales de 99 aminoácidos cada una. Se postula que se trata de una aspartoproteasa, bastante diferente a las proteasas aspárticas humanas, por lo que su tratamiento selectivo debe ser posible (Moyle, G.; Gazzard, B. *Drugs*, (1996) 51(5), 701-712). Al menos 6 inhibidores de proteasa HIV están en desarrollo clínico: saquinavir, indinavir, títonavir, nelfinavir (AG-1343), KNI-272 VX-478. También se utilizan en combinación con antiretrovirales del tipo de AZT (zidovudine) y 3TC (lamivudine). Incluso se preconiza la combinación de más de un inhibidor de proteasa posible combinado con la mezcla de AZT y 3TC, primera combinación de drogas permitida por la FDA con fecha 26 de septiembre de 1997.

Como resumen del tratamiento de la enfermedad se incluye el siguiente cuadro:

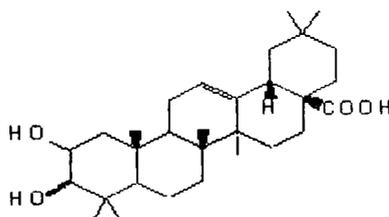
| Fármaco/clase | Dosificación diaria habitual en adultos | Comercializado por | Coste estimado por persona y año |
|------------------------------------|---|---------------------|----------------------------------|
| <i>Análogos de Nucleósido</i> | | | |
| RETROVIR (Zidovudina, AZT, ZDV) | Cápsulas, 600 mg | Glaxo-Wellcome | 205.000 pts |
| EPIVIP, (Lamivudina, 3 TC) | Comprimidos 300 mg | Glaxo-Wellcome | 630.000 pts |
| VIDEX (Didanosina, DDI) | Suspensión 300 mg | Bristol-Myers | 265.000 pts |
| HIVID (Zalcitabina, DDC) | Cápsulas 2,5 mg | Productos Roche | 256.000 pts |
| ZERIT (Estavudina, D4T) | Cápsulas 80 mg | Bristol-Myers | 275.000 pts |
| <i>Inhibidores de Proteasa</i> | | | |
| INVIRASA (Saquinavir mesilato) | Cápsulas 1800 mg | Productos Roche | 730.000 pts |
| CRIXIVAN (Indinavir) | Cápsulas 2400 mg | MSD | 550.000 |
| NORVIR (Ritonavir) | Cápsulas 1200 mg | Abbott Laboratories | 830.000 |
| VIRACEPT (Nelfinavir mesilato) | Comprimidos 2250 mg | Productos Roche | 570.000 |

(Continuación)

| Fármaco/clase | Dosificación diaria habitual en adultos | Comercializado por | Coste estimado por persona y año |
|--|---|----------------------|----------------------------------|
| <i>No-nucleosidos inhibidores de transcriptasa inversa</i> | | | |
| VIRAMUNE (Neviparina) | Comprimidos 400 mg | Boehringer Ingelheim | Por determinar |
| RESCRIPTOS (Delavirdina mesilato) | Comprimidos 1200 mg | Upjohn Pharmacia | 350.000 pts |

El estudio farmacóforo de inhibidores no peptídicos de proteasa HIV-1, realizado por miembros del Instituto Nacional del Cáncer americano conduce a 15 productos, uno de los cuales es un ácido triterpénico muy relacionado con el producto objeto de esta patente (Moyle, G.; Gazzard, B. *Drugs*, (1996) 51(5), 701-712) (Wang, S.; Milne, G. W. A.; Yan, X.; Posey, I.; Nicklaus, M. C.; Graham, L.; Rice, William G. *J. Med. Chem.*, (1996) 39(10),2047-54).

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/cgibin/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. Recientemente se ha publicado que este ácido, entre otros, presenta actividad *in vitro* frente al enzima aislado de la proteasa HIV-1 (Xu, Hong-Xi; Zeng, Fa-Quan, Wan, Min; Sim, Keng-Yeow, *J. Nat Prod.* (1996) 59(7), 643-645), aunque esta experiencia no presupone si el compuesto es capaz de actuar a nivel intracelular, circunstancia necesaria para combatir realmente al HIV, y de si hay margen entre su posible concentración terapéutica y la concentración admisible en función de su toxicidad. Consultado el banco de datos de patentes sobre el SIDA (AIDS Patents Database <http://aids.uspto.gov>), no aparece ninguna patente en la que el ácido maslínico esté implicado). 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). La Universidad de Granada ha patentado su 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)*). También ha sido patentada por la Universidad de Granada la preparación de cierto tipo de medicamentos frente a infecciones parasitarias (*Utilización de ácido maslínico como inhibidor de serio proteasas para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos del género Cryptosporidium (P9701029)*).



Acido maslínico

Descripción de la invención

Efecto del ácido maslínico sobre la replicación del VIH-1 en cultivos celulares

5 *Sistema de cultivo:*

- 1) Línea celular MT2
- 2) Cultivo primario de células mononucleadas de sangre periférico

10 *Virus:*

Aislado primario de VIH-1, obtenido a partir de células mononucleadas de sangre periférica(CNNSP), con cinética de replicación rápida/alta, fenotipo inductor de sincitios y tropismo linfocitotrópico.

15 *Ensayos en MT2*

Pruebas de toxicidad

- 20 1 µg/ml ----- Viabilidad del 94 % a los 6 días
- 10 µg/ml ----- Viabilidad del 96 % a los 6 días
- 100 µg/ml ----- Viabilidad del 0 % a los 6 días

25 *Inhibición del efecto citopático, inductor de sincitios y del nivel de antígeno p24(pg/ml) en cultivos de MT2 infectados por VIH-1 a diferentes MOIs y empleando diferentes concentraciones de ácido maslínico.*

| MOIS | Concentraciones de ácido maslínico(µg/ml) | | | | | | | | | |
|-----------------------|---|-------|-------|-------|-------------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 1,6 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 60 | 80 |
| 35 1.10 ⁻² | IS 4+ | IS 4+ | IS 4+ | IS 3+ | IS 2+> 1000 pg/ml | IS 2+ >1000 pg/ml | Tóxico | Tóxico | Tóxico | Tóxico |
| 40 1.10 ⁻³ | IS 4+ | IS 4+ | IS 4+ | IS 3+ | IS 2+ >1000 pg/ml | No ECP >1000 pg/ml | Tóxico | | | |
| 45 1.10 ⁻⁴ | IS 3+ | IS 3+ | IS 3+ | IS 2+ | IS 1+ 440 pg/ml | No ECP 451 pg/ml | Tóxico | | | |
| 50 1.10 ⁻⁵ | IS 2+ | IS 2+ | IS 2+ | IS 2+ | IS 1+ 203 pg/ml | No ECP 88 pg/ml | Tóxico | | | |

MOI= Proporción cantidad virus/célula

55 IS= Inducción de sincitios

ECP= Efecto citopático

60

ES 2 140 329 A1

Ensayos en CMMSP.

Pruebas de toxicidad con diferentes concentraciones de suero bovino fetal en el medio de cultivo. Viabilidad a los 6 días del cultivo

| | | Concentraciones de | | | |
|----|----------------------|------------------------|---------------------------|--------|--------|
| | | <u>Acido maslínico</u> | <u>Suero Bovino Fetal</u> | | |
| | | 20 % | 15 % | 10 % | 5 % |
| 5 | 5 $\mu\text{g/ml}$ | 57 % | 56 % | 48 % | 33 % |
| 10 | 10 $\mu\text{g/ml}$ | 50 % | 45 % | 40 % | 30 % |
| 15 | 15 $\mu\text{g/ml}$ | 32 % | 30 % | 29 % | 23 % |
| 15 | 20 $\mu\text{g/ml}$ | 33 % | 27 % | 25 % | 19 % |
| 15 | 25 $\mu\text{g/ml}$ | Tóxico | Tóxico | Tóxico | Tóxico |
| 15 | 30 $\mu\text{g/ml}$ | Tóxico | Tóxico | Tóxico | Tóxico |
| 15 | 3 5 $\mu\text{g/ml}$ | Tóxico | Tóxico | Tóxico | Tóxico |
| 20 | 100 $\mu\text{g/ml}$ | ----Tóxico | Tóxico | Tóxico | Tóxico |

Tóxico- Viabilidad cercana al 0%, detrucción total del cultivo.

Inhibición del efecto citopático inductor de sincitios y del nivel de antígeno p24 (pg/mL) en cultivos de CMNSP infectados por VIH-1 a diferentes MOIs y empleando diferentes concentraciones de ácido maslínico

| | <u>MOIS</u> | <u>Concentraciones de ácido maslínico($\mu\text{g/ml}$)</u> | | | | | | |
|----|--------------|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 |
| 30 | 1. 10^{-2} | IS 4+ | IS 4+ | IS 4+ | IS 4+ | Tóxico | Tóxico | Tóxico |
| 30 | 1. 10^{-3} | IS 4+ | IS 3+ | IS 4+ | IS 4+ | Tóxico | Tóxico | Tóxico |
| 35 | 1. 10^{-4} | IS 3+ | IS 3+ | IS 3+ | IS 3+ | Tóxico | Tóxico | Tóxico |
| 35 | 1. 10^{-5} | No ECP | No ECP | No ECP | No ECP | Tóxico | Tóxico | Tóxico |

MOI= Proporción cantidad virus/célula

IS= Inducción de sincitios

ECP= Efecto citopático

Tóxico= Destrucción total del cultivo

* Empleando un MOI de 1.10^{-5} no se detectó ECP en el cultivo control infectado y sin ácido maslínico.

Conclusiones

En los ensayos realizados en línea celular MT2, el ácido maslínico a las concentraciones de 25 y 30 $\mu\text{g/ml}$ fue capaz de inhibir la replicación de un aislado primario de VIH-1. A 25 $\mu\text{g/ml}$ se detectó disminución del efecto citopático y del nivel de antígeno p24 en el sobrenadante del cultivo, y a 30 $\mu\text{g/ml}$ ausencia total de efecto citopático y disminución también de antígeno p24.

En los ensayos realizados en cultivo primario de CMNSP, el ácido maslínico resultó tóxico para el cultivo a partir de 5 $\mu\text{g/ml}$ incluso disminuyendo las concentraciones de suero bovino fetal utilizado en el cultivo. La destrucción total del cultivo se observó a partir de concentraciones de 25 $\mu\text{g/ml}$ de ácido maslínico, mientras que entre 5 y 20 $\mu\text{g/ml}$ se observó disminución de la viabilidad entre el 57 % y el 19%. Las concentraciones de ácido maslínico entre 5 y 20 $\mu\text{g/ml}$ no produjeron ningún efecto inhibitorio de la replicación en ninguno de los cultivos infectados con diferentes cantidades de VIH-1.

ES 2 140 329 A1

Estos resultados, suficientemente buenos 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 HIV en una cantidad que puede llegar en caso necesario hasta 2500 mg/día de ácido maslínico durante 2/3 semanas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Utilización de inhibidores enzimáticos para la preparación, sólo en combinación con otros agentes, de medicamentos para el tratamiento de las enfermedades humanas o animales causadas por los agentes causantes del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, **caracterizada** porque el producto es inhibidor de la actividad de proteasas.

2. Utilización de inhibidores enzimáticos para la preparación, sólo en combinación con otros agentes, de medicamentos para el tratamiento de las enfermedades humanas o animales causadas por los agentes causantes del síndrome de inmunodeficiencia adquirida según reivindicación primera **caracterizada** porque el inhibidor empleado es 2-alfa,3-betadihidroxi-28-carboxioleaneno (*acido maslínico*).

3. Utilización de inhibidores enzimáticos, según reivindicaciones primera y segunda, en cualquier clase de forma farmacéutica.

4. Utilización de inhibidores enzimáticos, según reivindicaciones primera a tercera, en cualquier forma de administración galénica.

5. Utilización de inhibidores enzimáticos, según reivindicaciones primera a cuarta, en cualquier dosis por individuo y día.

25

30

35

40

45

50

55

60



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: A61K 31/19

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X | XU H-X et al.: "Anti-HIV triterpene acids from Geum japonicum", 1996, J. Natural Products, 59 (7), páginas 643-645, todo el documento, en particular, resumen; página 644, último párrafo; página 645, primer párrafo. | 1-5 |
| E | US 5916919 A (XU H-X et al.) 29.06.1999, todo el documento, en particular, columna 3, líneas 43-67; columna 4, líneas 1-25. | 1-5 |
| X | WO 9708180 A1 (SCHINAZI, R.F.) 06.03.1997, todo el documento. | 1,2,4,5 |
| X | WO 9726880 A2 (PHARMACIA & UPJOHN COMPANY) 31.07.1997, todo el documento. | 1,2,4,5 |
| X | US 5616578 A (OTTO M.J.) 01.04.1997, todo el documento. | 1,2,4,5 |
| X | WO 9735587 A (GLAXO GROUP LIMITED) 02.10.1997, todo el documento. | 1,2,4,5 |

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

27.12.1999

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1