



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 282 027**

② Número de solicitud: 200502349

⑤ Int. Cl.:
A61K 31/19 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **20.09.2005**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2007**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.10.2007

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Granada
Hospital Real, Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES**

⑦ Inventor/es:
García-Granados López de Hierro, Andrés

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Utilización de ácido maslínico como antiparasitario frente a protozoos del *Phyllum Apicomplexa*.**

⑤ Resumen:

Utilización de ácido maslínico como antiparasitario frente a protozoos del *Phyllum Apicomplexa*.

El ácido 2-alfa,3-betadihidroxi-28-carboxiolean-12-eno (ácido maslínico), sus sales y derivados se utilizan como inhibidores de serin-proteasas para la obtención de preparados destinados al tratamiento y prevención de parasitosis causadas en humanos y animales por las especies del *phyllum Apicomplexa*: *Eimeria*, *Toxoplasma*, *Neospora*, *Cyclospora*, *Isospora*, *Besnoisia*, *Babesia* y *Plasmodium*.

ES 2 282 027 A1

DESCRIPCIÓN

Utilización de ácido maslínico como antiparasitario frente a protozoos del *Phyllum Apicomplexa*.

5 **Objeto de la invención**

Los organismos protozoarios del *Phyllum Apicomplexa* tienen como característica común, y de ahí proviene esta agrupación, de formar en algún estadio de ciclo vital un complejo apical. Sin embargo esta circunstancia externa no es la más importante, sino que también tienen en común la producción de unos enzimas denominados serin-proteasas que tienen como función permitir junto con otras proteínas del complejo apical permitir la entrada al interior celular donde se van a reproducir, y 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 destinados tanto a una terapia preventiva, como limitativa o incluso curativa de las respectivas parasitosis.

15 **Estado de la técnica**

Los parásitos del género *Eimeria* son los responsables de una serie de parasitosis en intestino delgado y ciego fundamentalmente en aves estabuladas, aunque también inciden en roedores, mamíferos y peces. Las coccidiosis son enfermedades especie específicas que ataca tanto a las aves de corral y muchos otros animales estabulados incluida la piscicultura. Los coccidios suelen ser, dependiendo de la especie, parásitos muy específicos en cuanto al huésped. Se conocen numerosas especies diferentes de coccidios, constituyendo el grupo más amplio en cuanto al número de especies descritas dentro del *Phyllum Protozoa*, si bien son cinco las que causan los mayores daños en la avicultura mundial, afectando cada una de las especies a una porción diferente del tracto: *Eimeria acervulina* (mitad superior del intestino delgado), *E. tenella* (ciegos), *E. necatrix* (mitad media del intestino delgado), *E. maxima* (mitad inferior del intestino delgado) y *E. brunetti* (mitad inferior del intestino delgado, recto y cloaca). Estos organismos destruyen las células del tracto digestivo que normalmente son las que absorben los alimentos. Las formas agudas de la coccidiosis producen serios daños en los tejidos, causando hemorragias y finalmente incluso la muerte. En cuanto a los métodos de control pueden consistir únicamente en anticoccidiósicos, en ionóforos más vacunas o en ionóforos, productos químicos y vacunas. También existe la posibilidad de que el procedimiento de control sea exclusivamente vacunal y últimamente está demostrando cierta eficacia la betaína (Betafin[®], de Nordos <http://www.avicultura.com/docsav/ja0521270405-R-BETAFIN.pdf>), que ayuda al mantenimiento del balance hídrico e iónico de las células de los tejidos intestinales y tratamientos con *Lactobacillus casei* (C.R. Bautista *et al* Tec. Pec. Mex (2003), 41(3) 317-327) y enzimas que faciliten la digestión de cereales (M. Bedford *et al* (1996) *Wid Poultry Sci J*, (1996) 52, 61-68).

La toxoplasmosis es una enfermedad infecciosa ocasionada por un parásito, el *Toxoplasma gondii*, que se transmite por vía oral, a través de la ingesta con Ooquistes contaminantes en aguas y verduras o a través de la ingestión de quistes con taquizoitos en carnes o embutidos contaminados o por vía transplacentaria en el caso del hombre cuando la madre gestante sufre una toxoplasmosis aguda durante el embarazo. Tiene una distribución mundial y el hombre, que es un huésped intermediario, es relativamente resistente; raramente produce infecciones generalizadas graves en los adultos inmunocompetentes pero la afectación del feto en el embarazo, más frecuente y grave, ocasiona la toxoplasmosis neonatal, con muerte intrauterina o malformaciones craneanas o cardíacas que llevan a la subnormalidad, ceguera o problemas cardíacos en el recién nacido. En el adulto normal inmunocompetente el sistema inmunitario controla la infección por *Toxoplasma* produciendo quistes, que persisten de por vida en los tejidos del sujeto infectado, con especial predilección por el cerebro, retina, corazón y músculos. Cuando se ha tenido una infección previa por el *T. gondii* el sujeto tiene anticuerpos específicos, en mayor o menor cuantía, y se dice que son seropositivos para *T. gondii*. Diferentes estudios señalan que entre un 30-50% de estos pacientes y que tienen infección por VIH desarrollarán un toxoplasmosis cerebral durante su evolución, con un riesgo alto cuando sus cifras de CD4 estén por debajo de 100/mm³. En las personas infectadas por el VIH la toxoplasmosis ocasiona con frecuencia afectación del sistema nervioso central (toxoplasmosis cerebral). La profilaxis es complicada, empleándose cotrimoxazol en profilaxis (<http://www.ctv.es/USERS/fpardo/vihtoxo.htm>) primaria y PMT, sulfadiazina y leucovorina en profilaxis secundaria (<http://www.aidsmeds.com/espanol/IO/toxo.htm>).

Otra especie de coccidios de interés en Medicina veterinaria lo constituyen las especies de *Neospora* con ciclo biológico similar al de *Toxoplasma* anteriormente descrito (<http://bioresearch.ac.uk/browse/mesh/D018688.html>). La historia de neosporosis se inicia en 1984 con un reporte de Bjerkas en Noruega de un caso de encefalitis y miocarditis en caninos, producido por un protozoario. Dubey y col. en 1988 propusieron el nombre de *Neospora caninum* y lograron comprobar los postulados de Koch en esta especie. Thilsted y col en 1989 reporta su participación como causa de aborto en bovinos y un año después Dubey y su grupo demostraron la transmisión transplacentaria en caninos, felinos, ovinos y bovinos. En el año de 1991 fue considerada como la mayor causa de abortos bovinos en el Estado de California. En 1993 Conrad y col logran reproducir la enfermedad al inocular taquizoitos en bovinos en forma experimental. Desde el punto de vista diagnóstico el mismo Bjerkas en 1991 reportó que las cepas aisladas en caninos son idénticas a las aisladas en bovinos. Con este hallazgo y el desarrollo de técnicas de diagnóstico inmunohistoquímico (Lindsay, 1989) y de ELISA (Bjorkman, 1994) se amplían las herramientas diagnósticas. A pesar de los estudios realizados quedaban por definir algunos aspectos relacionados con el ciclo de vida del protozoario especialmente referentes con el huésped definitivo de la entidad, y aunque este tema fue elaborado desde 1988 por varios autores como Dubey y col, solamente en 1998 el grupo de McAllister y col, logran definir al perro como huésped definitivo al haber demostrado la presencia de oocistos en materia fecal de animales alimentados con tejidos infectados de taquizoitos (http://www.encolombia.com/veterinaria/acovez26101_evaluación.htm). Los taquizoitos pueden crecer

en cultivos celulares y son una fuente de antígeno para el diagnóstico serológico. Los primeros cultivos se hicieron en monocitos bovinos y en células endoteliales de la arteria cardio-pulmonar, actualmente se utilizan las células VERO y los fibroblastos humanos en forma rutinaria (Dubey y Lindsay, 1996). En la actualidad no existe una conducta de control, prevención ni tratamiento específico para la enfermedad. En la actualidad se está trabajando en la elaboración de vacunas como un método de prevención específico.

La cyclosporiasis está producida por parásitos del género *Cyclospora*, fundamentalmente la *C. cayetanensis* (http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/cyclospora/factsht_cyclospora.htm) y se manifiesta como infección intestinal. El tratamiento recomendado para la infección con *Cyclospora* es una combinación de dos antibióticos, trimetoprim-sulfamethoxazole-sulfamethoxazole, también conocido como Bactrim, Septra o Cotrim. Los seres humanos pueden ser los únicos anfitriones verdaderos para estos coccidian. Aunque el parásito se ha divulgado de los chimpancés de Uganda y los babuinos y los chimpancés de Tanzania, éstos pueden representar realmente unas o más especies morfológicamente similares. Se han descrito 3 nuevas especies de primates aunque los datos morfológicos y moleculares sugirieron poca diferencia entre los tres y con la encontrada en seres humanos. No obstante, un estudio más reciente sugiere que los oocysts derivados de seres humanos puedan no ser infecciosos a los primates no humanos. Hay también informes del parásito en perros y aves de corral, pero es probable que el anterior sea de *Hammondia heydorni* o de *Neospora caninum* y el último de *Eimeria mitis* o un pseudo-parásito (<http://www.k-state.edu/parasitology/cyclospora/cyclospora.html>). La persona que tiene diarrea por cyclosporiasis debe mantener reposo y beber abundantes de líquidos.

Isoospora fue descrito por primera vez en 1860 por Virchow, (http://www.seimc.org/control/revi_Para/isoporabelli.htm) (LINDAY DS, DUBEY JP, BLAGBURN BL. Biology of *Isoospora spp.* from humans, nonhuman primates, and domestic animals. Clin Microbiol Rev 1997; 10:19-34) pero no fue denominado como tal hasta 1923. Afecta a adultos y niños de forma transitoria, pero puede llegar a cronificar en pacientes inmunocomprometidos, en los que la diarrea es grave. Ha sido también implicado como agente etiológico en la diarrea del viajero. Es la única especie de *Isoospora* que parasita al hombre, puesto que la especie inicialmente descrita como *Isoospora hominis* es actualmente una especie de *Sarcocystis*. El hombre es el único hospedador conocido de *I. belli*, aunque se desconoce si algunos animales podrían actuar como hospedadores paraténicos, lo que explicaría su transmisión por un mecanismo distinto a la contaminación fecal del agua o alimentos en áreas con adecuadas condiciones sanitarias. Los quistes son muy resistentes a las condiciones medioambientales, pudiendo permanecer viables durante meses en ambientes frescos y húmedos. También ha sido descrita la transmisión sexual como consecuencia de prácticas de sexo oral. Las infecciones por *I. belli*, aunque de distribución cosmopolita, son más frecuentes en regiones tropicales y subtropicales, especialmente en Haití, México, Brasil, El Salvador, África tropical y sureste asiático y se han asociado con brotes diarreicos en instituciones cerradas, inmigrantes y pacientes infectados por el VIH. El número de casos de isosporiasis descritos ha aumentado en los últimos años, coincidiendo con el aumento de casos de SIDA, pasando de ser una enfermedad rara a considerarse causa frecuente de diarrea en inmunodeprimidos. La incidencia de infección por *I. belli* varía de un 0,2-3% en pacientes con SIDA en EEUU a un 8-20% en África. Entre los pacientes con SIDA en EEUU la isosporiasis parece estar relacionada con viajes y/o inmigración reciente de países de América latina. Se han usado muchos agentes para tratar las infecciones por *I. belli*. Las combinaciones de inhibidores de la dihidrofolato reductasa timidilato sintetasa, como el trimetopim (TMP) o la pirimetamina, con sulfonamidas como el sulfametoxazol (SMX), sulfadiazina o sulfadioxina son de probada eficacia, siendo el cotrimoxazol (TMP-SMX) el tratamiento de elección. El uso de cotrimoxazol para el tratamiento o prevención de la neumonía por *Pneumocystis carinii* previene la adquisición de la primoinfección por *I. belli* o las recrudescencias de la infección. La pirimetamina sola también es eficaz en pacientes con alergia a las sulfonamidas. En un estudio en pacientes con SIDA tratados con TMP-SMX (160/800 mg) cuatro veces al día durante 10 días, la diarrea y el dolor abdominal desaparecía al cabo de uno a seis días después del tratamiento y todas las muestras de heces examinadas al final del mismo eran negativas. También se estudió la profilaxis secundaria en estos pacientes: 10 de ellos recibieron placebo, 5 de los cuales desarrollaron infección recurrente en 1-3 meses; otros 10 recibieron TMP-SMX (160/800 mg) vía oral, tres veces a la semana y 1 paciente desarrolló infección asintomática; a 12 se les administró la combinación de pirimetamina con sulfadioxina (25/500 mg) vía oral, una vez a la semana y ninguno presentó recurrencias. Se ha sugerido que los pacientes con SIDA que viajen a zonas endémicas reciban quimioprofilaxis con TMP-SMX. La besnoitosis es una parasitosis de la piel, vasos sanguíneos, membranas mucosas y otros tejidos producida por diversas especies del género *Besnoitia* (<http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/50500.htm>) y es económicamente importante en áreas endémicas produciendo mortalidad (10%), esterilidad y depreciación del ganado. Se suele tratar con sulfanilamida y oxitetraciclina.

La babesiosis (<http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/babesia/default.htm>) es otra parasitosis producida por protozoos del género *Babesia* que invade y se replica en eritrocitos maduros, destruyendo generalmente este eritrocito por lo que genera una anemia con pérdida severa de peso y a veces la muerte (<http://www.vet.uga.edu/lvpp/NSEP/babesia/ENG/index.htm>). La forma más usual de combatirla en las zonas ganaderas es con preinoculación con sangre infectada, provocando una vacunación. El perro presenta esta infección (causada por *Babesia gibsoni* y *Babesia canis*) mucho más frecuentemente que el gato. Es considerada una zoonosis emergente puesto que, en las dos últimas décadas de este siglo, en las zonas templadas la incidencia de babesiosis humana se ha incrementado. No hay una especie de *babesia* propia de los humanos, quienes se infectan con *babesias* específicas de los animales domésticos o de roedores silvestres. La transmisión se da por la picadura de garrapatas. El cuadro clínico varía desde cuadros fulminantes (agudos) a leves, incluso autolimitarse, por lo que la enfermedad suele pasar desapercibida y, en muchas ocasiones, ni siquiera se diagnostica. El tratamiento de elección en la actualidad es tratar la parasitosis con antiparasitarios específicos (Dipropionato de Imidocarb y Aceturato de Diminazeno) y una correcta terapia de sostén. La babesiosis del

ganado vacuno constituye una parasitosis de importancia económica elevada dadas las amplias zonas del planeta en donde afecta y la elevada mortandad que ocasiona especialmente en terneros.

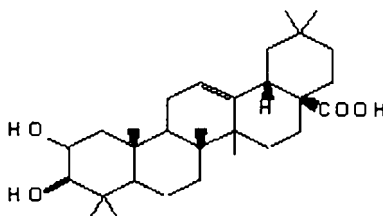
El *Plasmodium falciparum* tiene la característica mórbida de ser el parásito protozooico más mortal de seres humanos. Como todos los parásitos de la malaria (<http://www.monografias.com/trabajos/malaria/malaria.shtml>) es un organismo con una reproducción sexual obligatoria que ocurra en el mosquito. El paludismo se transmite principalmente por la picadura de la hembra del mosquito anopheles infectada por parásitos palúdicos. La hembra que necesita sangre como fuente de proteínas para el desarrollo y maduración de los huevos. La complejidad de los procesos que tienen lugar desde que chupan sangre, hasta que efectúan la puesta de los huevos, constituye el ciclo gonotrófico de la hembra. Todo el ciclo de desarrollo del mosquito, desde la fecundación, el desarrollo del huevo, de la larva y la linfa hasta la aparición del mosquito alado, se efectúa en el transcurso de 2 a 4 semanas. El ciclo vital del *Plasmodium* comienza con un cigoto en el estómago del mosquito hembra. El cigoto es el resultado de la fertilización; así, el ciclo en el mosquito es la fase sexual. El cigoto es activo y se mueve atravesando el estómago y la pared del intestino medio. El parásito en este caso es un “*vermiculo viajero*” y se llama oocineto. Bajo el epitelio del intestino, el oocineto se vuelve redondeado, forma un quiste que se denomina oocisto. El núcleo del oocisto se divide repetidamente para formar muchos núcleos, cada uno de los cuales, con el citoplasma que lo rodea, se transforma en una célula separada, alargada, y un esporozoito. En consecuencia el oocisto se agranda mucho y finalmente estalla, liberando miles de esporozoitos. El desarrollo de estos esporozoitos se conoce con el nombre de esporogonia, teniendo lugar dentro de las glándulas salivares del mosquito varias esporogonias con lo que el número de esporozoitos que el mosquito puede inyectar con su picadura son de varios miles en cada ingesta de sangre. Cuando entran los esporozoitos en la corriente sanguínea del hombre por la picadura del mosquito comienzan una serie de ciclos que afectan a diferentes células principalmente hepáticas. La sangre no es infecciosa durante las primeras etapas iniciales de la infección y los macrófagos fijos o células de Kuffer. Dentro de estas células, el parásito es al principio conocido con el nombre de criptozoito por que no se encontraba en los frontis de sangre y así estaba oculto a la vista. Su cuerpo aumenta de tamaño y su núcleo se divide varias veces. La segmentación del núcleo es la base para el otro término, el esquizonte, que se refiere a la forma asexual con división múltiple del núcleo pero sin segmentación de la célula parásita. La división de los núcleos del esquizonte es la esquizogonia. Finalmente, la célula parásita se divide en tantas unidades como núcleos tiene y la célula huésped se rompe liberando los nuevos parásitos. Estos nuevos parásitos son metacriptozoitos (llamados también merozoitos), los cuales penetran en otras células de los tejidos y repiten el ciclo equizogónico. Esta repetición al parecer no ocurre en el ciclo del *Plasmodium falciparum*. Hasta estos momentos los parásitos no han entrado en los eritrocitos; así han estado en la fase exoeritrocítica. Los metacriptozoitos llegan a la corriente sanguínea y penetran en los eritrocitos y comienza la fase eritrocítica del ciclo vital. En los hematíes de la sangre, en los frontis típicamente teñidos, el plasmódium muestra un núcleo teñido de rojo y un citoplasma de forma anular teñido de azul. Este aspecto da origen al nombre anillo de sello para el parásito en este periodo la configuración anular está alterada cuando la célula protozoaria comienza a crecer dentro del eritrocito. En este periodo el plasmodio puede ser activo y se denomina un trofozoito. Estos parásitos intracelulares engloban porciones del citoplasma del huésped. De nuevo tiene lugar la esquizogonia. El esquizonte está caracterizado por núcleos en división o segmentación, y así algunas veces se denomina un segmento. El plasmodio se segmenta en merozoitos que son comparables a los metacriptozoitos formados anteriormente en el ciclo vital. Los merozoitos salen de los hematíes de cada uno de ellos puede penetrar a otro eritrocito, o incluso el parénquima del hígado, y repetir el proceso de la esquizogonia. Es interesante observar que las fases fuera de los eritrocitos tienen un índice metabólico mucho más alto que ocurre en el interior de otras células del huésped. Finalmente algunos de los merozoitos en los hematíes se transforman en formas sexuales que comienzan con cuerpos sólidos pequeños y se desarrollan hasta formar elementos masculinos microgametocitos o femeninos macrogametocitos. Cuando un mosquito pica al hombre en esta fase ciclo vital los micro y macro gametocitos penetran en el estómago de insecto y allí maduran transformándose en microgametos y macrogametos. Los microgametos son: proliferaciones con flagelos de los microgametocitos. Se desprenden y se comportan como los espermatozoides en los animales superiores. Tiene lugar ahora la fertilización y el cigoto, así transformado completa el ciclo vital. En áreas endémicas, el paludismo de primoinfección afecta fundamentalmente a niños y adolescentes. Éste se caracteriza por la presencia secuencial de la triada escalofrío, fiebre y sudoración, con duración de hasta horas en su primera fase y de hasta cuatro en las dos últimas. Dado que los ataques por *P. vivax* y *P. falciparum* se repiten cada tercer día, cada 48 horas, el cuadro ha sido denominada *terciana*, *berigna* y *maligama*, respectivamente. La reproducción cada cuarto día, cada 72 horas, de los ataques de *P. malariae*, caracteriza a esta malaria como cuartana. La anemia es uno de los signos cardinales siendo su origen multifactorial. El diagnóstico de malaria es esencialmente parasitológico. Las drogas más empleadas en el tratamiento específico de la malaria y su acción sobre cada estadio parasitario, según se trate de *P. falciparum* o de otras especies. La quinina tiene presentación oral, como sulfato, y parenteral, como diclorhidrato; su uso ha vuelto a incentivar a raíz de la emergencia de cepas de *P. falciparum* resistentes a la cloroquina. La mepacrina es un compuesto acridínico, considerado un buen sustituto de la quinina, pero es inefectivo para las cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina. Las 4-aminoquinolinas incluyen a la cloroquina y al clorhidrato de amodiquina. La coroquina está disponible en sus sales de fosfato y sulfato, tanto para uso oral como parental. Los anhibidores de la síntesis de ácido fólico (sulfas y sulfonas) y el ácido folínico (pirimetamina y proguanil-cicloguanil) se presentan en separados individuos como en combinaciones, radicando se mayor utilidad en la profilaxis que en el tratamiento de la malaria. Por otro lado debemos recalcar que el tratamiento radical de *P. vivax* y, posiblemente, *P. malariae* exige terapia combinada de 4 y 8-aminoquinolinas. Lo recomendado es administrar cloroquina base en una dosis total de 1.5 g. para adultos o de 2.5 mg/kg para niños, en el lapso de 3 días, y, simultánea o secuencialmente, primaquina en dosis de 15 mg diarios para adultos, o de 0.3 mg/kg/día para niños mayores de 6 meses, por 14 días. La cura radical de *P. falciparum* sensible a la cloroquina se consigue exclusivamente con coroquina. Debido a que ésta no es gameticida efectiva del *P. falciparum*, para evitar que el enfermo se convierta en reservorio de la infección, se recomienda dar el primer día una dosis única de priquina, de 45 mg para adultos y proporcional para niños. El manejo

de estos pacientes requiere de supervisión continua de preferencia en unidades de cuidado intensivo, con vigilancia estrecha de las funciones vitales, del equilibrio hidrosalino, gases arteriales, funciones hepáticas y renal, variables hematológicas y de coagulación, así como de las cuentas parasitarias. La profilaxis de malaria significa protección completa contra todos los estadios del ciclo vital del parásito en el humano, incluido el esporozoito. No existiendo al momento drogas capaces de matar a los esporozoitos, se entiende que aún no es factible una verdadera profilaxis contra malaria. En infecciones por *P. falciparum*, el uso de proguanil o pirimetamina puede erradicar la fase pre-eritrocítica del parásito en el hepático; a ésta se le ha denominado "profilaxis casual". La erradicación de los estadios eritrocitarios del parásito antes que produzcan síntomas clínicos, se conoce como "profilaxis supresiva" y se consigue con el uso de cualquier esquizontocida eritrocitario. Lo recomendado en lugares donde no se han encontrado resistencias a Cloroquina es la administración de cloroquina base 300 mg para adultos o 0.5 mg/kg para niños, una vez por semana desde poco antes hasta 4 semanas después de la exposición en un área endémica. La prevención completa de *P. vivax* y, posiblemente, *P. malariae* incluye la administración de primaquina, para adultos, en dosis de 45 mg/semana durante el mismo lapso o de 15mg/día por 14 días al cesar la exposición, y en dosis equivalentes para niños. La Malaria en general afecta a unos 200 millones de personas causando directamente más de un millón de muertes anuales.

Otro parásito de este mismo Phylum es el *Cryptosporidium* y ha sido el primer parásito sobre el que hemos demostrado la eficacia del ácido maslínico para su inhibición (Utilización de ácido maslínico como inhibidor de serin-proteasas para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos del género *Cryptosporidium* P9701029). 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 serin-proteasas (alpha-1-antitripsina (AAT), antipaina, aprotinina, leupetina, metoxysuccinil-ala-ala-pro-valina clorometilcetona (MAAPVCK), inhibidor de tripsina de soja (SBTI) y fenilmetil-sulfonil 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.

Clycospora cayetanensis es otro de los protozoos donde se ha demostrado la intervención de las serin proteasas en la patogenia del mismo, causantes de diarreas fulminantes ha causado ya a pesar de su cercano conocimiento, epidemias diarreicas en USA, afectando a la exportación de frutas frescas desde Iberoamérica, donde el parásito es endémico.

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 23 plantas <http://www.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/chemdisp.xsql?chemical=MASLINIC-ACID>. Se conoce su actividad como antihistamínico y anti-inflamatorio, 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

Los ensayos con *Toxoplasma* se han realizado "In vitro" sobre células Vero cultivando estas en medio RPMI1640 con un 10 por ciento de suero fetal y sobre ellas se han adicionado los taquizoitos de *Toxoplasma gondii* en relación 100 taquizoitos por célula. La interacción con el ácido maslínico y sus sal sódica se realizó en el momento de la

ES 2 282 027 A1

infección estando la molécula en contacto con las células y el parásito durante 12 horas. La evaluación de los resultados se realizó a las 24 y 48 horas tras fijación y tinción de las células, calculándose el porcentaje de inhibición de la parasitación con respecto a células infectadas de la misma manera pero que fueron cultivadas en ausencia de ácido maslínico y consideradas como control. En las figuras se muestran las dosis en microgramos/mililitro y los porcentajes de inhibición de la parasitación a las diferentes horas del estudio. Los resultados obtenidos (ver figura 1) indican que a concentraciones de aproximadamente 45 microgramos/mililitro se inhibe al 100% la entrada del *Toxoplasma* 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 de preparaciones que contengan ácido maslínico, sus sales y derivados adecuados, sólo o en combinación con otras materias que complementen su acción o la lleven a cabo de forma sinérgica, como materia activa frente a la infección por *Toxoplasma*, en una cantidad que puede llegar en caso necesario hasta 2500 mg por kg día de ácido maslínico durante el tiempo necesario para que remita la parasitosis o para prevenir la misma. En el caso de *Neospora sp*, la forma de actuar, los resultados y las conclusiones son muy similares, y se encuentran reflejados en la figura 2. Para las experiencias con *Eimerias* se ha empleado una cepa muy activa *Eimeria tenella*.

Los ensayos “*In vitro*” se han realizado en este caso sobre células MDCK cultivando estas en medio RPMI1640 con un 10 por ciento de suero fetal y sobre ellas se han adicionado los esporozoitos procedentes de ooquistes esporulados de *Eimeria tenella* en relación 10 esporozoitos por célula, dada la gran actividad de esta cepa. La interacción con el ácido maslínico y sus sal sódica se realizó en el momento de la infección estando la molécula en contacto con las células y el parásito durante 12 horas. La evaluación de los resultados se realizó a las 24 y 48 horas tras fijación y tinción de las células, calculándose el porcentaje de inhibición de la parasitación con respecto a células infectadas de la misma manera pero que fueron cultivadas en ausencia de ácido maslínico y consideradas como control. En las figuras se muestran las dosis en microgramos/mililitro y los porcentajes de inhibición de la parasitación a las diferentes horas del estudio. Los resultados obtenidos indican que a concentraciones de aproximadamente 45 microgramos/mililitro se inhibe al 100% la entrada de la *Eimeria* en las células. Realizadas estas experiencias con tres protozoos representativos del *Phyllum Apicomplexa*, teniendo además en cuenta los resultados ya patentados por nosotros sobre el efecto del ácido maslínico en el género *Cryptosporidium*, podemos concluir que todos los integrantes de este *Phyllum*, que utilizan serin-proteasas como procedimiento invasivo a sus respectivas células diana, se ven inhibidos por la acción del ácido maslínico y sus sales.

Resultados de inhibición frente a concentración:

Concentración ug/ml	% Inhibición
<i>Toxoplasma</i> 24 Horas	
Conc. 0,005 um	34,72
Conc. 0,09 um	76,25
Conc. 0,1 um	77,74
Conc. 11 um	83,29
Conc. 60 um	87,12
<i>Toxoplasma</i> 48 Horas	
Conc. 0,005 um	63,54
Conc. 0,09 um	80,54
Conc. 0,1 um	88,9
Conc. 11 um	93,08
Conc. 60 um	94,84
<i>Eimeria</i> 24 Horas	
Conc. 0,005 um	31,27
Conc. 0,09 um	64,22
Conc. 0,1 um	73,28
Conc. 11 um	82,11
Conc. 60 um	86,34

ES 2 282 027 A1

(Continuación)

	Concentración ug/ml	% Inhibición
5	<i>Eimeria</i> 48 Horas	
	Conc. 0,005 um	62,81
	Conc. 0,09 um	78,33
10	Conc. 0,1 um	84,55
	Conc. 11 um	93,65
	Conc. 60 um	95,88
15	<i>Neospora</i> 24 Horas	
	Conc. 0,005 um	29,72
	Conc. 0,09 um	62,49
20	Conc. 0,1 um	72,97
	Conc. 11 um	80,02
	Conc. 60 um	84,44
25	<i>Neospora</i> 48 Horas	
	Conc. 0,005 um	61,67
	Conc. 0,09 um	72,28
30	Conc. 0,1 um	85,12
	Conc. 11 um	94,76
	Conc. 60 um	97,65

35 Así, los inhibidores enzimáticos y, en concreto el 2-alfa,3-betadihidroxi-28-carboxioleaneno (*ácido maslínico*), sus sales o sus derivados, pueden utilizarse para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de las enfermedades humanas o animales causadas por los parásitos patógenos del *Phyllum Apicomplexa*. En particular para el tratamiento los géneros *Eimeria*, *Toxoplasma*, *Isospora*, *Neospora*, *Cyclospora*, *Besnoisia*, *Babesia* o *Plasmodium*.

40 Dadas las características de estos inhibidores, el medicamento resultante puede administrarse en cualquier forma, particularmente galénica u oral.

Las dosis de inhibidores enzimáticos que contienen estos medicamentos están comprendidas entre 0.0001 mg y 2500 mg por kg de individuo y día.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de inhibidores enzimáticos para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de las enfermedades humanas o animales causadas por los parásitos patógenos del *Phyllum Apicomplexa*.
2. Utilización de inhibidores enzimáticos para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de las enfermedades humanas o animales causadas por los parásitos patógenos de cualquiera de los géneros siguientes: *Eimeria*, *Toxoplasma*, *Isospora*, *Neospora*, *Cyclospora*, *Besnoisia*, *Babesia* o *Plasmodium*.
- 10 3. Utilización de inhibidores enzimáticos según reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque el producto resultante es inhibidor de la actividad de serin proteasas.
- 15 4. Utilización de inhibidores enzimáticos, según reivindicaciones 1, 2 ó 3 **caracterizado** porque la dosis utilizada de los mismos está comprendida entre 0.0001 mg y 2500 mg por kg de individuo y día.
5. Utilización de inhibidores enzimáticos, según reivindicaciones 1, 2, 3 ó 4 **caracterizado** porque el producto resultante es una forma farmacéutica.
- 20 6. Utilización de inhibidores enzimáticos, según reivindicaciones 1, 2, 3 ó 4 **caracterizado** porque el producto resultante es una forma de administración galénica.
7. Utilización de inhibidores enzimáticos, según reivindicaciones 1, 2, 3 ó 4 **caracterizado** porque el producto resultante es una forma de administración oral.
- 25 8. Utilización de inhibidores enzimáticos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizada** porque el inhibidor utilizado es 2-alfa,3-betadihidroxi-28-carboxioleaneno (*ácido maslínico*), sus sales o sus derivados.

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 282 027

② N° de solicitud: 200502349

③ Fecha de presentación de la solicitud: **20.09.2005**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 31/19** (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2005034838 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 21.04.2005, todo el documento; ver reivindicación 26.	1,2,4,5-7
X	WO 9712582 A2 (AGRIMMUNE, INC.) 10.04.1997, todo el documento.	1-3,4-7
X	ES 2131467 A1 (UNIVERSIDAD DE GRANADA) 16.07.1999, todo el documento.	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
29.08.2007

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/1