

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 454**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2009** **E 09724203 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016** **EP 2260851**

54 Título: **Ácido oleanólico para el tratamiento de la esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

28.03.2008 ES 200800873

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.10.2016

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (100.0%)
C/ Serrano 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**NIETO CALLEJO, MARÍA LUISA;
MARTÍN MONTAÑA, RUBÉN;
CARVALHO TAVARES, JULIANA y
RUIZ GUTIÉRREZ, VALENTINA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 586 454 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ácido oleanólico para el tratamiento de la esclerosis múltiple

5 La presente invención considera una composición farmacéutica que comprende como principio activo el ácido oleanólico, para la profilaxis y el tratamiento de la esclerosis múltiple. La invención pone de manifiesto la capacidad de este compuesto natural, presente en la cutícula de las aceitunas y en las hojas del olivo, así como en los aceites donde estas fracciones tienen una presencia importante (aceite de orujo de oliva), para reducir notablemente los signos clínicos de la encefalomielite autoinmune experimental, denominada en el presente documento EAE. Esta acción se asocia a un aumento tanto del peso como de la supervivencia de los animales de experimentación así como a una disminución de la inflamación y la permeabilidad cerebrovascular. Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica y/o nutracéutica con aplicaciones para tratar la Esclerosis Múltiple (en adelante EM).

15 **Antecedentes de la invención**

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune, inflamatoria y degenerativa del sistema nervioso central (SNC) que se dirige contra las proteínas de mielina del cerebro y la médula espinal. Se considera como una de las principales enfermedades neurológicas de los adultos jóvenes, pero aunque es más común en mujeres, la gravedad de la enfermedad es más pronunciada en los portadores del sexo masculino. La EM se caracteriza por la presencia de placas o lesiones de desmielinización en la materia blanca del SNC, dando como resultado la conducción nerviosa anormal que afecta principalmente al control muscular. Los signos y síntomas varían ampliamente, dependiendo de la localización de las lesiones. Por tanto, i) los síntomas motores pueden incluir la alteración del habla, la debilidad, los temblores y la dificultad al caminar, ii) los síntomas sensoriales pueden incluir la sensación de adormecimiento, los hormigueos, el dolor y las alteraciones visuales y iii) los síntomas psicológicos pueden incluir cambios en el estado de ánimo y depresión. En la mayoría de los pacientes, la enfermedad se presenta durante o después de una etapa anterior de recaídas y remisiones, mientras que en un pequeño porcentaje de pacientes (10-15 %), la evolución de la enfermedad es progresiva desde el principio. Los ataques conducen a un proceso continuo de desmielinización y remielinización, que causa la cicatrización de las fibras nerviosas y una incapacidad progresiva. Aunque la causa exacta de la enfermedad es todavía desconocida, varios estudios han apoyado la hipótesis de una etiología viral, pero ninguno de los virus estudiados se ha revelado como el agente causal buscado. Por ello, las teorías actuales sugieren que la etiología de la EM puede estar relacionada con una combinación de factores autoinmunes, medioambientales y víricos que actúan junto con una predisposición genética subyacente.

35 La encefalitis autoinmune experimental (EAE) inducida en cepas susceptibles de animales proporciona el mejor modelo disponible para entender los acontecimientos en la EM y para ensayar nuevos fármacos que podrían conducir a terapias novedosas (Raine et al. *Lab Invest.* 1980, 43: 150-7). En este modelo la inmunización del SNC se consigue mediante la inyección de antígenos específicos (proteína básica de la mielina, proteína proteolípídica de la mielina, o glicoproteína de mielina/oligodendrocito) y adyuvantes, que inducen un ataque mediado por linfocitos T en el cerebro y en la médula espinal (Pettinelli y McFarlin, *J. Immunol.* 1981, 127: 1420-1423). Por tanto, en el SNC de los animales con EAE se observan infiltrados inflamatorios perivasculares y parenquimatosos que consisten principalmente en linfocitos T (CD8⁺ y CD4⁺), células B y macrófagos activados que han atravesado la barrera hematoencefálica (BHE), debido a alteraciones en su permeabilidad. Posteriormente, se produce la activación de células residentes tales como la microglía y los astrocitos (Schonrock LM. et al *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1998, 24: 320-30). Dependiendo de la especie y/o la cepa animal así como del antígeno utilizado, las lesiones inflamatorias pueden ir acompañadas, o no, de áreas de desmielinización. Uno de los rasgos característicos de la EAE es la progresiva pérdida de peso durante la fase clínica de la enfermedad, que revierte rápidamente cuando los animales se recuperan (Ruuls et al, *J. Immunology*, 1996, 157:5721-5731). La recuperación también se asocia a la producción de citocinas tales como la IL-10 y el TGF- (Kennedy et al., *J. Immunol.* 1992, 149:2496-2505).

50 Los tratamientos actualmente disponibles para la esclerosis múltiple pretenden suprimir el componente inmunoinflamatorio de la enfermedad. En la actualidad, el trastorno se trata sintomáticamente mediante la administración de dosis altas de glucocorticoides al inicio de los síntomas neurológicos agudos. Sin embargo, debido a los numerosos y graves efectos secundarios de los corticoides, no es posible realizar una terapia preventiva continua. Algunos pacientes también reciben agentes inmunosupresores, aunque con frecuencia se toleran mal. Por tanto es necesario identificar nuevos tratamientos para la EM para resolver los problemas anteriormente mencionados y minimizar o ralentizar la progresión de la enfermedad.

60 Por tanto, la investigación farmacológica se centra en hallar agentes terapéuticos novedosos, y en los últimos años el reino vegetal está demostrando ser un recurso excelente para el hallazgo de esos nuevos compuestos. Incluso, se han desarrollado varias líneas de investigación que buscan analizar los efectos beneficiosos de los compuestos naturales presentes en los vegetales, con el fin de relacionar la composición de la dieta con el desarrollo/modulación de enfermedades inmunoinflamatorias, para definir posibles estrategias terapéuticas nutricionales. En este contexto, el ácido oleanólico es un triterpenoide pentacíclico del grupo de los oleananos presente en plantas utilizado frecuentemente en la medicina tradicional de diversos países. Se encuentra en forma de ácido libre o como agliconas de saponinas triterpenoideas (Liu J., *J Ethnopharmacol* 1995, 49: 57-68) y se ha aislado a partir de

diversas especies de plantas, incluyendo la *Olea europaea*.

La bibliografía, desde el año 1906, (Canzoneri F., *Gazz chim ital*, 1906; 36:372) reconoce que el ácido oleanólico es un constituyente permanente de hojas y frutos del olivo. En el olivo, se halla principalmente en hojas, frutos verdes, especialmente en la cutícula y en el licor residual del tratamiento de las aceitunas. Se encuentra además en las aceitunas maduras, el aceite de oliva y el aceite de orujo.

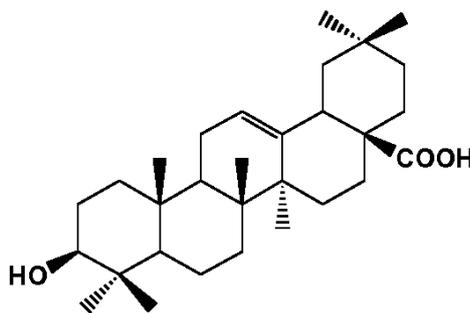
Existen numerosas publicaciones sobre las propiedades terapéuticas de los triterpenos y en particular existen múltiples estudios que recogen las actividades biológicas y farmacológicas del ácido oleanólico. Éstas incluyen: actividad hepatoprotectora (Liu Y et al., *Toxicology Letters* 1998, 95: 77-85), antiinflamatoria (Mañez S et al. *Eur J Pharmacol.* 1999, 334: 103-5; Marquez-Martin A et al. *Cytokines.* 2006), antitumoral (R. Martín et al. *Cancer Res.* 2007, 67: 3741-51, John ME et al. *J Nutr.* 2006, 136: 2553-7), anti-VIH (Zhu YM et al., *Bioorg Med Chem Lett.* 2001, 11: 3115-8; Kashiwada Y et al., *J Nat Prod.* 1998, 61: 1090-5), vasodilatadora (R. Rodríguez-Rodríguez et al. *Br J Nutr.* 2004, 92: 635-42), hipoglucemiante (H. Sato et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007, 362: 793-8, Yoshikawa M et al., *Biofactors.* 2000, 13: 231-7) e hipolipemiante (BL Ma. *Traditional Medicine and Pharmacology.* 1986, 2: 28-29).

La presente invención se refiere a la búsqueda de nuevos tratamientos para la EM y describe una nueva aplicación farmacológica del ácido oleanólico como agente que reduce notablemente los signos clínicos e inmunoinflamatorios de la encefalomiелitis autoinmune experimental.

Sumario de la invención

Descripción breve

La presente invención describe el ácido oleanólico para la prevención y/o el tratamiento de la esclerosis múltiple. El ácido oleanólico (ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico) tiene la siguiente fórmula:



Ácido oleanólico

La invención también desvela una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido oleanólico, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a una composición que comprende ácido oleanólico como agente que reduce los signos clínicos e inmunoinflamatorios observados en la encefalomiелitis autoinmune experimental inducida en ratones C57BL/6 (hembras de 6-8 semanas de edad), modelo animal de la esclerosis múltiple y que además retrasa significativamente el inicio de la enfermedad, en particular (véase el Ejemplo 1):

- a) La administración i.p. diaria de 6 mg/kg de ácido oleanólico (AO1) disminuye la gravedad de la enfermedad, y
- b) La administración i.p. diaria de 6 mg/kg de ácido oleanólico (AO2) retrasa el inicio de la EAE.

Estas acciones se manifiestan a través de: i) la mejora de los síntomas neurológicos, ii) la ganancia de peso, iii) la disminución de la extravasación celular y molecular, iv) la disminución de la expresión de proteínas clave en procesos inflamatorios, v) el aumento de la supervivencia de los ratones con EAE.

Por tanto, los resultados indican que este triterpeno podría tener efectos protectores sobre la integridad de la BHE y sobre los acontecimientos inflamatorios relacionados con el desarrollo de la EAE, que podrían dar lugar a la mejora de los síntomas clínicos asociados a la EM, en el modelo de EAE, así como a otras alteraciones neurodegenerativas. Además, ya que este producto es una sustancia natural que puede aislarse de las aceitunas, este compuesto podría usarse como un suplemento de la dieta o en preparaciones nutracéuticas.

De este modo, un objeto de la presente invención es el uso de ácido oleanólico en el desarrollo de composiciones farmacéuticas para la prevención y/o el tratamiento de la esclerosis múltiple.

5 En la presente invención, la expresión "ácido oleanólico" también incluye sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables.

Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica para el tratamiento de la esclerosis múltiple, en adelante "composición farmacéutica de la presente invención", que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido oleanólico, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 En la presente divulgación, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sustancias o combinación de sustancias, conocidas en la industria farmacéutica, utilizadas en la preparación de formas farmacéuticas e incluye adyuvantes, sólidos o líquidos, disolventes o tensioactivos.

La composición farmacéutica también puede contener uno o más agentes terapéuticos que, con el tiempo, potencien la acción terapéutica del compuesto de triterpeno pentacíclico o aumenten su espectro de actividad.

20 El ácido oleanólico estará presente en la composición farmacéutica en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, en una cantidad apropiada para ejercer su efecto terapéutico. En una realización particular, la composición farmacéutica proporcionada por la presente invención, contiene entre el 0,01 % y el 99,99 % en peso de ácido oleanólico, y puede estar disponible en cualquier forma farmacéutica apropiada de acuerdo con la vía de administración elegida, por ejemplo, oral, parenteral, intraperitoneal o tópica. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de sus procedimientos de preparación puede encontrarse, por ejemplo, en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, 1ª edición, 1993, Luzán 5, Ediciones SA.

Breve descripción de los dibujos

30 **Figura 1:** Efecto sobre la pérdida de peso (A) y sobre los síntomas clínicos (B) debido a la progresión de la enfermedad por efecto del ácido oleanólico inyectado diariamente después de la aparición de los primeros síntomas. AO1.

35 **Figura 2:** Efecto sobre la pérdida de peso (A) y sobre los síntomas clínicos (B) debido a la progresión de la enfermedad por efecto del ácido oleanólico inyectado diariamente 7 días después de la inmunización. AO2.

Figura 3: El ácido oleanólico disminuyó la adherencia (A) y el rodamiento (B) de los leucocitos sobre la microvasculatura del cerebro, analizada por microscopía intravital. C, ratones sanos. EAE, ratones inducidos. EAE+AO1, ratones inducidos tratados con AO al inicio de los síntomas clínicos. EAE+AO2, animales inducidos tratados con AO a partir del día 7 después de la inmunización.

40 **Figura 4:** Cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de ratones sin tratar y tratados con AO. Se usó colorante azul de Evans como medición de la extravasación de proteínas plasmáticas en (A) la corteza cerebral, (B) el cerebelo y (C) la médula espinal 21-24 días después de la inmunización. C, ratones sanos. EAE, ratones inducidos. EAE+AO1, ratones inducidos tratados con AO al inicio de los síntomas clínicos. EAE+AO2, animales inducidos tratados con AO a partir del día 7 después de la inmunización.

45 **Figura 5:** Efecto del AO sobre la expresión de osteopontina (OPN) en tejidos del SNC: (A) la corteza cerebral, (B) el cerebelo y (C) la médula espinal, de ratones sanos y con EAE, analizado mediante kits de ELISA comerciales. C, ratones sanos. EAE, ratones inducidos. EAE+AO1, ratones inducidos tratados con AO al inicio de los síntomas clínicos. EAE+AO2, animales inducidos tratados con AO a partir del día 7 después de la inmunización.

50 **Figura 6:** Potenciación de la supervivencia de los ratones con EAE debido al efecto del tratamiento con ácido oleanólico, inyectado después de la aparición de los primeros síntomas.

Breve descripción de las realizaciones

Ejemplo1.- El ácido oleanólico reduce los signos clínicos en ratones con EAE.

60 En los experimentos se usaron quince animales por grupo. La EAE se indujo como se ha descrito (Slavin A. *Autoimmunity* 1998, 28: 109) en ratones C57BL mediante la administración de una proteína proteolípida. La inmunización se realizó con 100 µg de un péptido parcial de glucoproteína de mielina/oligodendrocito (MOG₃₃₋₅₅) en adyuvante completo de Freund, que contenía 4 mg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra en 1 ml. Los ratones se inmunizaron mediante una inyección subcutánea de esta emulsión en el día 0. Además, en los días 0 y 2, se les administraron por vía intraperitoneal 300 ng/200 µl de toxina de *Bordetella pertussis*. La administración de 6 mg/kg de ácido oleanólico se realizó por vía intraperitoneal una vez al día, comenzando:

- 1.- 12 días después de la inducción de la EAE, cuando se detectaron los síntomas clínicos, hasta el final del experimento (21 días después de la inducción) (AO1), y
- 2.- 7 días después de la inducción de la EAE, antes del inicio de la enfermedad, hasta el final del experimento (21 días después de la inducción) (AO2).

5 Los ratones se examinaron, se pesaron y se puntuaron diariamente con sistema doble ciego para determinar signos de la EAE. Los ratones con EAE tratados con AO se compararon con un grupo de animales con EAE tratados con placebo, con animales de control sin tratar o con animales de control que recibieron la misma dosis diaria de ácido oleanólico. Además, se realizó una evaluación patológica para confirmar el efecto de mejora del estado de la enfermedad. El peso de los ratones de cada grupo se representa en las figura 1 A y 2 A. El nivel de parálisis alcanzado cada grupo de ratones se muestra en las figuras 1 B y 2 B.

Evaluación del efecto del ácido oleanólico: Puntuaciones

15 El efecto de mejora de la enfermedad (efecto clínico) por acción del ácido oleanólico se puntúa y se evalúa con el patrón que se presenta a continuación.

- Grado 0, sin anomalía.
- Grado 0.5, pérdida parcial/reducción del tono de la cola, evaluado mediante la incapacidad de rizar el extremo distal de la cola (cola 50 % o 2/3).
- Grado 1.0, atonía de la cola del 100 %.
- Grado 1.5, marcha ligeramente/moderadamente torpe, capacidad de enderezamiento alterada.
- Grado 2.0, debilidad de las patas traseras, parcial (1 o 2).
- Grado 2.5, parálisis parcial de las patas traseras, parcial (1 o 2).
- Grado 3, parálisis completa de las patas traseras.
- Grado 3.5, debilidad de los miembros.
- Grado 4, tetrapléjico. Parálisis completa de los miembros.
- Grado 5, estado moribundo o muerte.

30 Los signos de parálisis comenzaron a desarrollarse alrededor de los días 11-14 (atonía de la cola y marcha torpe) después de la inmunización, apuntando a la inducción de la EAE.

35 En la figura 1B, se muestra la evolución de los signos de parálisis de ratones con EAE sin tratar, en comparación con los ratones con EAE tratados con AO. Los ratones tratados con 6 mg/kg del compuesto triterpénico natural aislado de aceite de orujo, el ácido oleanólico, mostraron una mejora significativa del estado clínico de la enfermedad en comparación con el grupo con EAE sin tratar. Además, la gravedad de la EAE también se atenuó significativamente con la administración profiláctica de ácido oleanólico, ya que se observó un retraso en el inicio de la enfermedad (Fig. 2B). En ambas situaciones, la reducción del peso corporal se suprimió, mostrando una recuperación (Fig. 1A) o efecto preventivo (Fig. 2A).

40 Además, como se ha mencionado anteriormente, en la EM existe una infiltración de células inflamatorias en el SNC debido a la degradación de la barrera hematoencefálica, provocando la extravasación tanto celular como molecular. Estos fenómenos se producen principalmente en las vénulas donde el flujo sanguíneo es menor. Para estudiar las interacciones leucocito-endotelio que se producen *in vivo* en la microcirculación (fundamentalmente los fenómenos de rodamiento y de adhesión leucocitaria), se usó la microscopía intravital de fluorescencia. La Figura 3 muestra los leucocitos adherentes (A) y rodantes (B). Los animales con EAE mostraron un aumento significativo de ambos parámetros en comparación con los animales de control sanos. En cambio, cuando los ratones pertenecían a los grupos del protocolo EAE+AO1 o del protocolo EAE+AO2, se observó una disminución significativa del flujo de leucocitos en rodamiento y adheridos al endotelio, en comparación con el grupo con EAE sin tratar. Después, para caracterizar los cambios en la permeabilidad vascular, se inyectó azul de Evans por vía intraperitoneal a los diferentes grupos de animales. La Figura 4 muestra la filtración que se produce en la médula espinal, el cerebro y el cerebelo. Los ratones del protocolo EAE+AO1 y del protocolo EAE+AO2 presentan una filtración significativamente disminuida en los tres tejidos del SNC estudiados, en comparación con los animales con EAE sin tratar.

55 El análisis de la expresión de proteínas proinflamatorias claves en la EAE, condujo al estudio de la presencia y modulación de la osteopontina en tejidos del SNC. La Figura 5 muestra que en todos los tejidos estudiados, la médula espinal, el cerebro y el cerebelo, la expresión de esta proteína está aumentada en ratones con EAE, en comparación con los ratones de control sanos. Este aumento se redujo significativamente cuando los ratones se trataron con ácido oleanólico, siguiendo ya sea el protocolo AO1 o el AO2.

60 En términos de supervivencia (Fig. 6), se observó que en el grupo con EAE tratado con placebo, los ratones murieron en el plazo de los primeros 40 días tras la inducción de la enfermedad. En cambio, cuando los ratones con EAE recibieron ácido oleanólico al inicio de los síntomas, los animales no murieron hasta los 60 días después de la inducción.

65

Material y métodos

Animales de experimentación

5 Los animales se alojaron en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. Los ratones se alimentaron con una dieta especial para animales de laboratorio, agua a discreción, temperatura de 20-24° C y expuestos a un ciclo de luz de 12 h/día (8.00 a.m. - 8.00 p.m.) (Consejo de Comunidades Europeas, 1986). Todos los protocolos experimentales se revisaron y fueron aprobados por el Comité de Ética de investigación Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid.

10

Reactivos

Los siguientes productos químicos empleados en los experimentos fueron proporcionados por Sigma Chemical Co. (San Luis, MO, EE.UU.): adyuvante completo de Freud, *M. tuberculosis* H37 RA, toxina de *B. pertussis*, rodamina 6G y Azul de Evans. El kit de ELISA para la detección de la osteopontina era de IBL (Hamburgo, Alemania). El compuesto natural ácido oleanólico fue suministrado por Cymit Química S.L. (Barcelona, España).

15

El triterpeno pentacíclico, ácido oleanólico, se disolvió inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar una solución madre de 10⁻² M. Las posteriores diluciones del triterpeno también se realizaron en DMSO. La concentración final de DMSO alcanzada (inferior al 0,001 %) no afectó significativamente a los resultados.

20

Inducción de la EAE

La enfermedad EAE progresiva crónica se indujo en ratones hembra C57BL/J6 de 8-10 semanas de edad siguiendo el protocolo descrito por (Slavin A. *Autoimmunity* 1998, 28:109-20). A los ratones se les inyectó en la base de la cola bilateralmente un inóculo que contenía 100 µg de péptido MOG 33-55 emulsionado con adyuvante completo de Freud que contenía 0,4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA. Después, se administró una inyección i.p. de 300 ng/animal de toxina de *B. pertussis*, dos veces, con un intervalo de 48 horas. Los animales se examinaron diariamente para controlar la pérdida de peso y el inicio de los síntomas neurológicos.

30

Análisis de osteopontina en el SNC

Se sacrificaron animales de los diferentes grupos de experimentación en el día 21 después de la inmunización y se prepararon extractos de proteína del SNC (corteza cerebral, cerebelo y médula espinal) mediante la homogeneización en una solución: NaCl 0,4 M, Tween 20 al 0,05 %, BSA al 0,5 %, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM, cloruro de bencetonio 0,1 mM, EDTA 10 mM y aprotinina 20 KI (100 mg de tejido/ml). El homogenizado se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C. La concentración de osteopontina se determinó en los sobrenadantes mediante un kit de ELISA comercial.

35

Microscopía intravital en el cerebro de los ratones

Las técnicas de microscopía intravital permiten el estudio de las interacciones leucocito-endotelio. Los leucocitos que interaccionan con la superficie endotelial pueden visualizarse debido a que su velocidad se reduce notablemente, en comparación con la velocidad promedio del flujo sanguíneo en la vénula. Para realizar un estudio preciso de las interacciones leucocito-endotelio, primero se hizo un registro de la vénula durante un minuto usando una videocámara y, en un segundo tiempo, se realizó un análisis más detallado. Los parámetros de interés eran el número de leucocitos adheridos al endotelio venular (número de leucocitos estacionarios durante más de 30 segundos), el número de leucocitos rodantes (número de leucocitos por minuto que se mueven a una velocidad menor que la de los eritrocitos).

50

La craneotomía se realizó en la región parietal. Los animales recibieron la administración i.v. de rodamina 6G (0,3 mg/kg de peso corporal) para fijar los leucocitos. La fluorescencia asociada a la rodamina 6G se visualizó mediante epi-iluminación a 510-560 nm. El microscopio (20×) se usó para observar los acontecimientos micro-circulatorios en el cerebro. Una cámara de vídeo acoplada a un microscopio proyectaba las imágenes en un monitor, que se grabaron en vídeo un análisis adicional de los leucocitos en rodamiento y adhesión.

55

Análisis de alteraciones en la extravasación

El colorante Azul de Evans es capaz de unirse cuantitativamente a la albúmina, tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta propiedad se ha usado ampliamente para la cuantificación de la extravasación proteica como índice del aumento de la permeabilidad vascular e, indirectamente, del daño tisular. El Azul de Evans, una vez extravasado hacia los tejidos, se retira de los mismos y después se cuantifica mediante espectrofotometría visible.

60

Ratones de todos los grupos de experimentación recibieron por vía i.p. 30 mg/kg de peso de Azul de Evans. Después, se retiraron la médula espinal, el cerebro y el cerebelo y se lavaron en solución salina. El colorante se extrajo de los tejidos del SNC con formamida y la concentración se determinó midiendo la absorbancia a 620 nm. El

65

tejido del SNC se secó a 24 h a 60 °C y se pesó. El colorante extravasado se expresó como μg de Azul de Evans/mg de peso seco del tejido.

Análisis Estadístico

5

Los datos se trataron usando la prueba U de Mann Whitney. Los resultados se expresan como la media \pm DS; se consideraron estadísticamente significativos valores de $P < 0,05$.

REIVINDICACIONES

1. Ácido oleanólico para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la esclerosis múltiple.
- 5 2. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple en la que la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido oleanólico, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 10 3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 que comprende adicionalmente uno o más agentes terapéuticos.

Figura 1

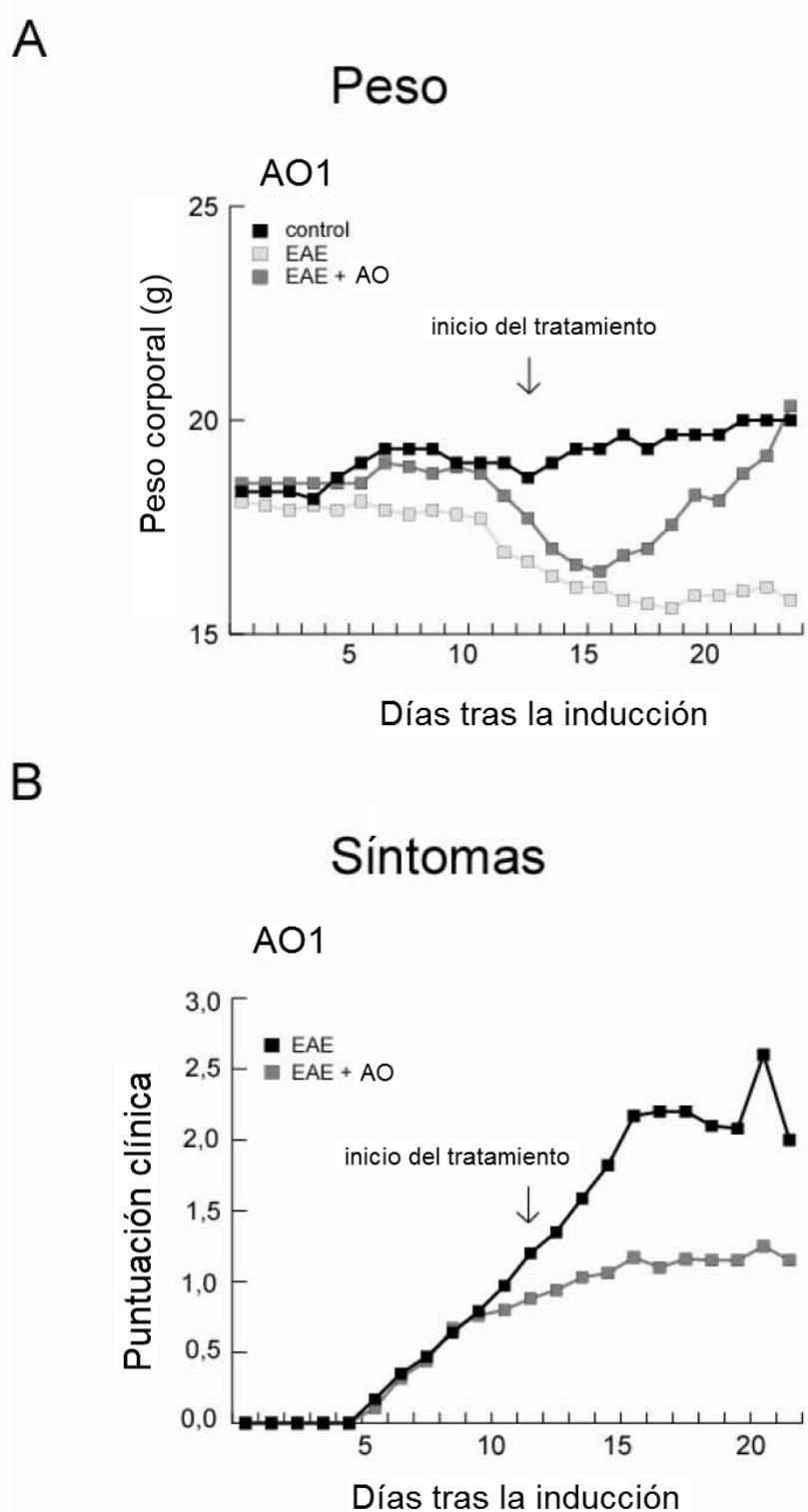
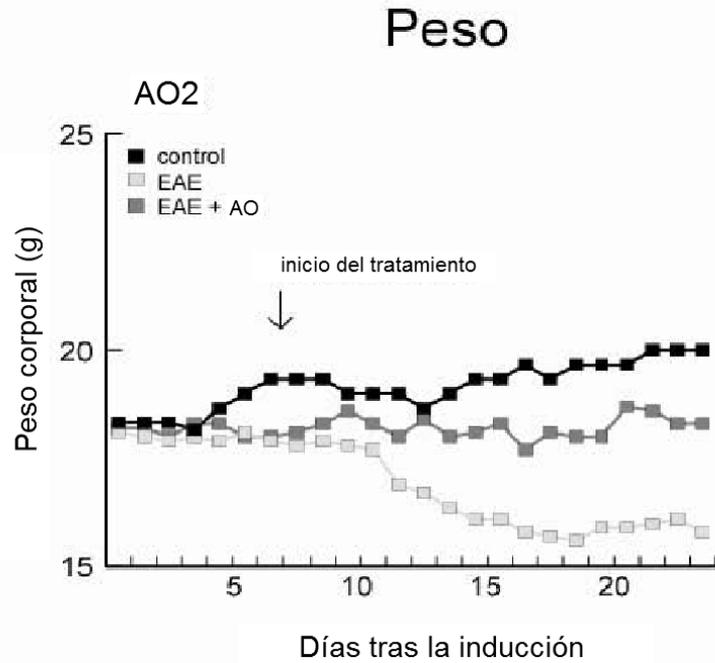


Figura 2

A



B

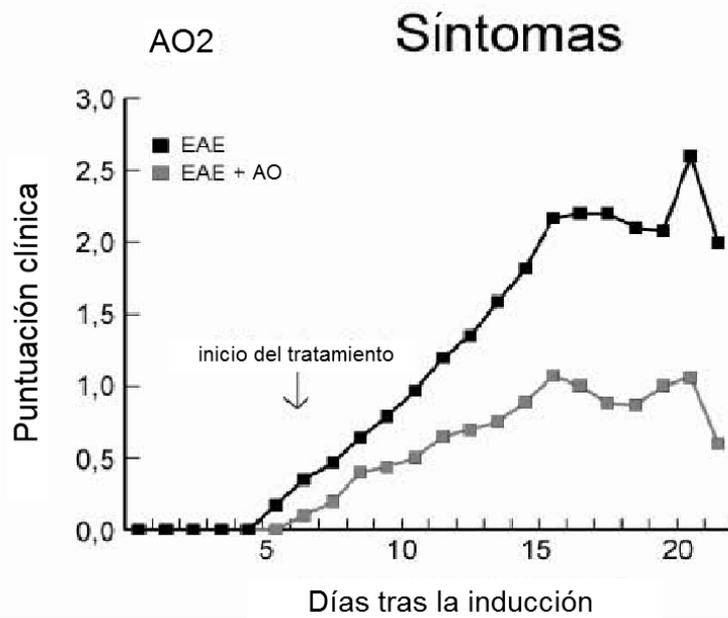


Figura 3

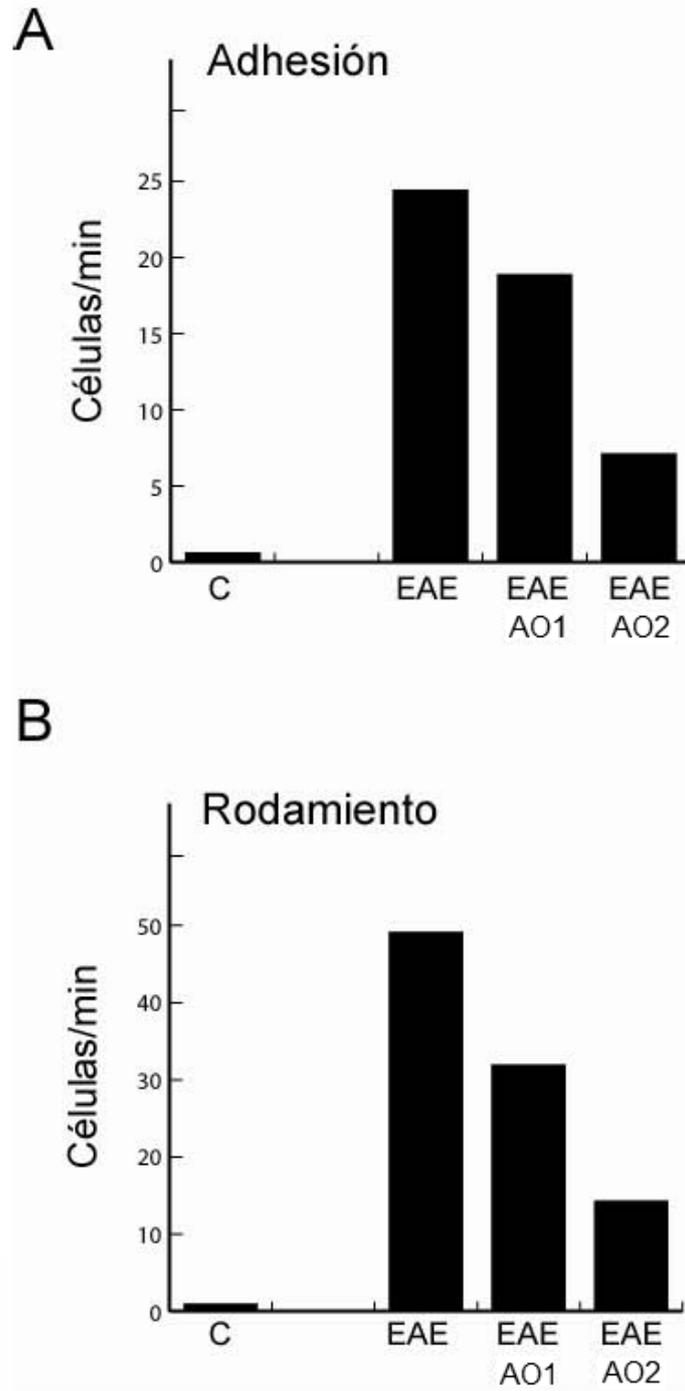


Figura 4

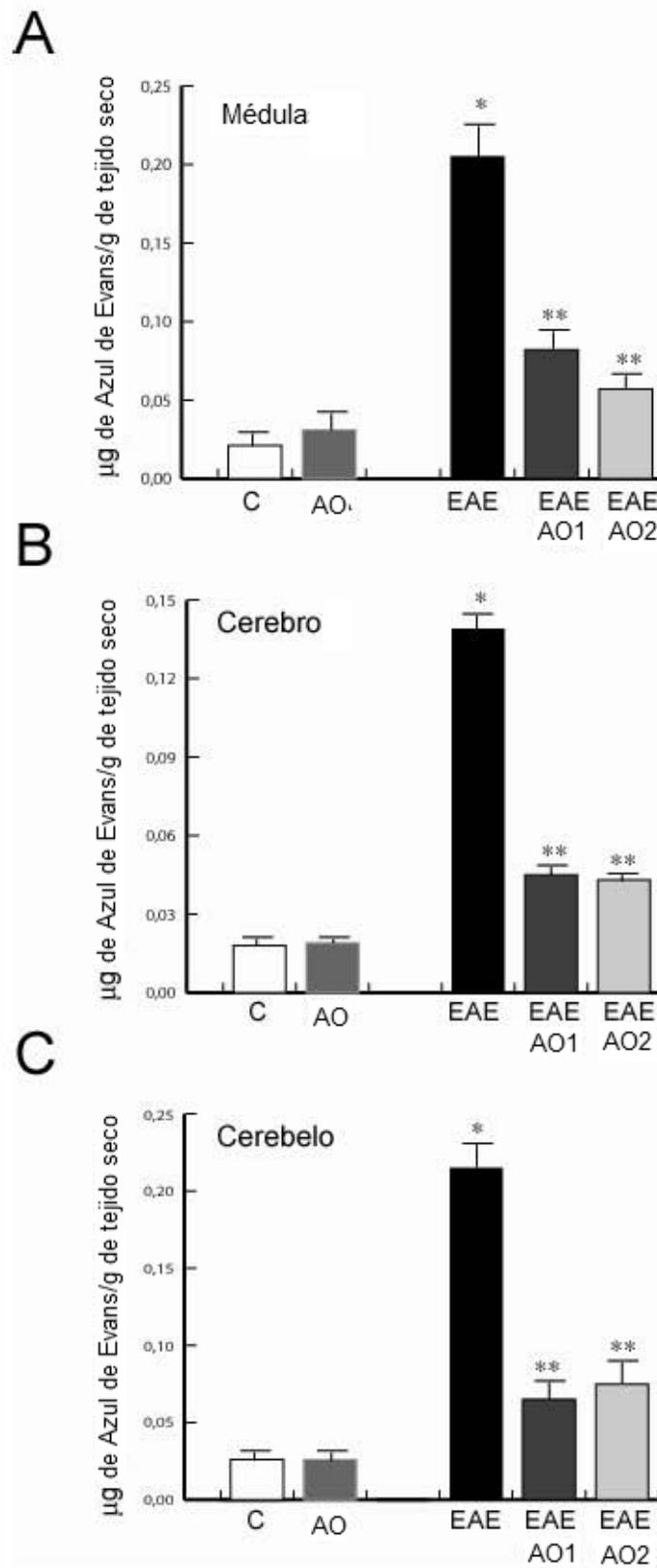


Figura 5

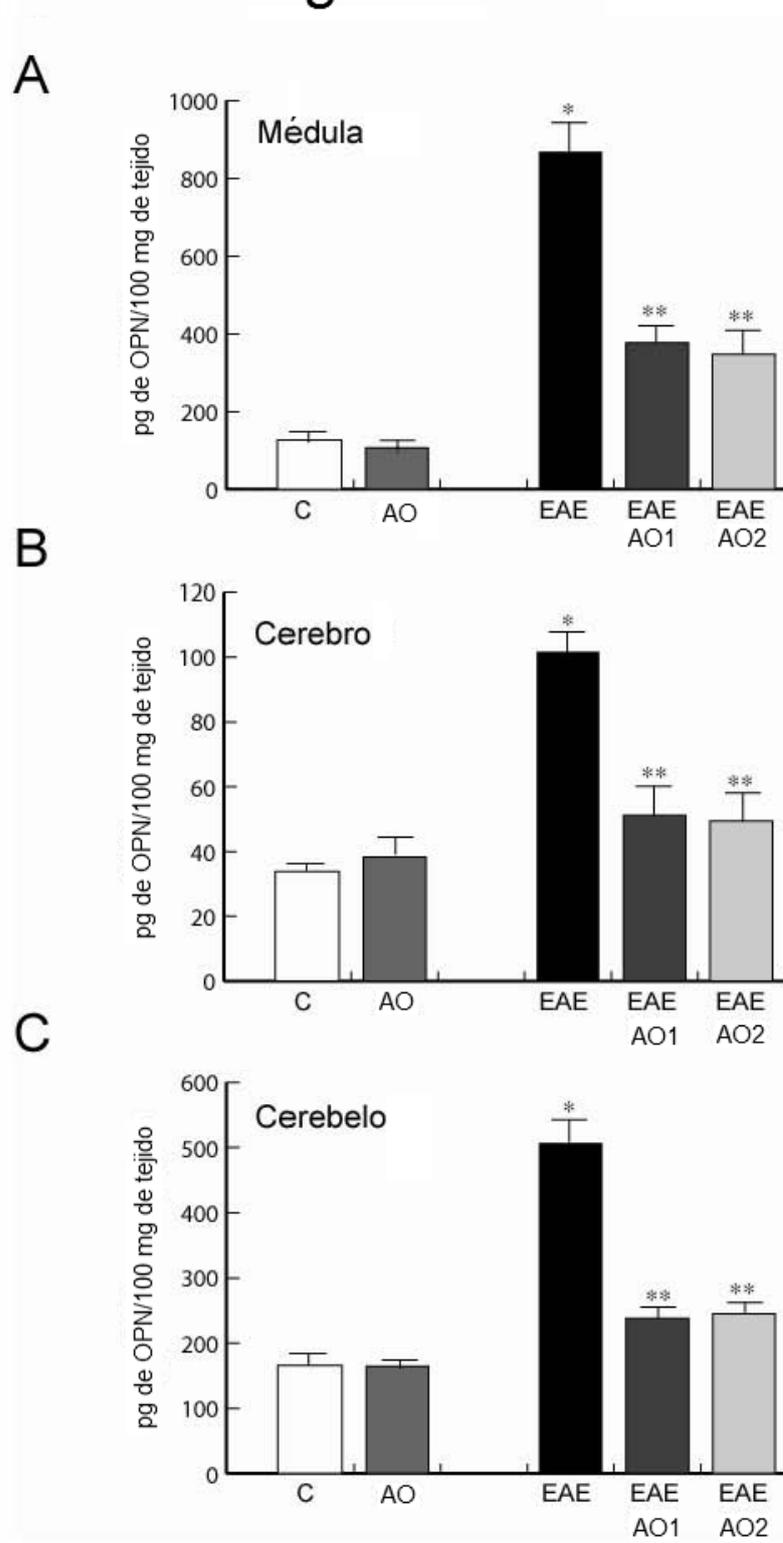


Figura 6

