



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 261**

51 Int. Cl.:
A61K 31/343 (2006.01)
A61P 25/22 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07786654 .9**
96 Fecha de presentación : **10.08.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2068863**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.06.2009**

54 Título: **Derivados de ligustilide para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central.**

30 Prioridad: **11.08.2006 EP 06016770**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.04.2011

73 Titular/es: **DSM IP ASSETS B.V.**
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es: **De Saizieu, Antoine;**
Goralczyk, Regina y
Schueler, Goede

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 357 261 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

Derivados de ligustilide para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central.

La presente invención se refiere al uso de ligustilide en el método de tratamiento de ciertos trastornos relacionados con la neurotransmisión deficiente, así como a las composiciones farmacéuticas y dietéticas que contienen dicho compuesto y a sus usos.

Es bien sabido que la neurotransmisión deficiente, por ejemplo, niveles bajos de neurotransmisores, está relacionada con enfermedades mentales, tales como depresión y trastornos de ansiedad generalizada (TAG), y con una mayor sensibilidad al estrés.

Los documentos JP 05 155768 (Kao Corp.) y Bjeldanes *et al.* 1978 *J. Food Sci.* 43(1):143 muestran que la 3-*n*-butilfalida puede inducir el sueño.

El documento JP 05-247022 de Naito Takashi *et al.* (Tsumura & Co) muestra que varios compuestos, incluido ligustilide, pueden mejorar la función cerebral en pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

Los compuestos que aumentan los niveles de neurotransmisores en el cerebro y aumentan de este modo su transmisión, muestran por lo tanto propiedades antidepresivas, así como efectos beneficiosos en otros tipos de trastornos mentales ("Neurotransmitters, drugs and brain function" R.A. Webster (ed.), John Wiley & Sons, Nueva York, 2001, págs. 187-211, 289-452, 477-498). Los principales neurotransmisores son serotonina, dopamina, noradrenalina (= norepinefrina), acetilcolina, glutamato, ácido gamma-aminobutírico, así como neuropéptidos. El aumento en la neurotransmisión se consigue mediante el aumento en la concentración del neurotransmisor en la hendidura sináptica, lo que permite por consiguiente que este se encuentre disponible para una neurotransmisión mayor o prolongada, mediante la inhibición de la recaptación en la terminación nerviosa presináptica, o bien mediante la prevención del catabolismo del neurotransmisor inhibiendo enzimas degradantes tales como las monoaminoxidasas A y B.

Los antidepresivos tricíclicos (ATC) tales como imipramina, amitriptilina y clomipramina, por ejemplo, inhiben la recaptación de la serotonina y la noradrenalina. Se considera que se encuentran entre los antidepresivos más eficaces disponibles, pero presentan una serie de desventajas debido a que interaccionan con varios receptores del cerebro, por ejemplo, con los receptores colinérgicos. Cabe destacar que los ATC no son seguros cuando se toma una sobredosis, ya que frecuentemente muestran una cardiotoxicidad pronunciada.

Otro tipo de fármacos antidepresivos son los llamados ISRS (inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina), que incluyen fluoxetina, paroxetina, sertralina, citalopram, fluvoxamina, los cuales bloquean el transportador de la serotonina (SERT), un transportador del neurotransmisor dependiente de cloruro sódico de gran afinidad que finaliza la neurotransmisión serotoninérgica mediante la recaptación de serotonina. Se ha demostrado que son igualmente eficaces en el tratamiento de la depresión y la ansiedad, y habitualmente se toleran mejor que los ATC. Habitualmente, estos fármacos se empiezan a tomar en dosis bajas y se puede aumentar la dosis hasta alcanzar un nivel terapéutico. Un efecto secundario habitual son las náuseas. Otros posibles efectos secundarios incluyen pérdida de apetito, boca seca, sudoración, infección, estreñimiento, bostezos, temblores, insomnio y disfunción sexual.

Además, los compuestos que previenen el catabolismo de los neurotransmisores, más ampliamente mediante la inhibición de las monoaminoxidasas (MAO) A y B, muestran efectos antidepresivos. Las MAO catalizan la oxidación de los neurotransmisores que contienen un grupo amino, tales como serotonina, noradrenalina y dopamina.

Además, los moduladores de la neurotransmisión ejercen efectos pleiotrópicos en las funciones mentales y cognitivas. Estas funciones difieren claramente de aquellos efectos descritos para los constituyentes alimenticios/vegetales con función antioxidante, los cuales ejercen un efecto neuroprotector mediante la reducción del estrés oxidativo.

Además, los pacientes suelen sufrir como una comorbosidad con la depresión o bien de por sí el trastorno de ansiedad generalizada (TAG). El TAG es una afección ansiosa muy frecuente y es una enfermedad crónica en la atención primaria (aproximadamente el 10% de los pacientes) (Wittchen *et al.* 2005. *European Neuropsychopharm.* 15:357-376). Los pacientes se presentan ellos mismos a su médico de atención primaria con múltiples síntomas físicos. El TAG se caracteriza por una tensión crónica y por una preocupación y tensión ansiosas (> 6 meses), las cuales son incontrolables e incapacitantes, y vienen acompañadas por un trastorno de hipervigilancia característico (que incluye inquietud, tensión muscular y problemas de sueño). Si no se trata, el TAG sigue un curso fluctuante crónico y tiende a volverse más grave con la edad. Los pacientes con TAG sufren depresión subsindrómica y contribuyen a la carga económica global directa e indirecta de la salud más elevada de todos los trastornos de ansiedad y depresión. A pesar de la elevada incidencia del TAG, pocos enfermos son diagnosticados, se les prescribe medicación o son derivados al psiquiatra, se necesitan herramientas de diagnóstico simple para facilitar el reconocimiento del paciente y su evaluación. Aparte de diagnósticos específicos, los médicos requieren tratamientos eficaces para los síntomas del TAG. Los ISRS, tales como paroxetina, son eficaces para el tratamiento del TAG [Stocchi *et al.* 2003 *J. Clin. Psych.* 63(3):250-258]. Algunos artículos de revisión sistemáticos y ensayos clínicos aleatorizados (RCT, por sus siglas en inglés) controladas por placebo también indican que algunos ISRS (escitalopram, paroxetina y sertralina), el ISRN (inhibidor selectivo de la recaptación de norepinefrina) venlafaxina, algunas benzodiazepinas (alprazolam y diazepam), la imipramina tricíclica y el agonista parcial de 5-HT_{1A} buspirona son todos ellos eficaces para tratamientos graves. En general, el efecto del

tratamiento suele ser moderado y los síntomas reaparecen cuando el periodo de tratamiento se interrumpe. Por lo tanto, un tratamiento continuo a largo plazo o la prevención con compuestos que tienen menos efectos secundarios, como los ISRS, y que pueden tomarse durante periodos de tiempo largos puede ser favorable frente a un tratamiento con fármacos.

5 Se necesitan compuestos para el tratamiento o la prevención de enfermedades y/o trastornos mentales que no muestren los efectos secundarios negativos de los antidepresivos conocidos. Muchos pacientes están interesados en terapias alternativas que puedan minimizar los efectos secundarios asociados con las dosis elevadas de los fármacos y que puedan proporcionar beneficios clínicos adicionales. La depresión grave es una enfermedad recurrente de larga duración, cuyo diagnóstico suele ser erróneo. Además, muchos pacientes sufren depresión leve o de gravedad moderada. Por consiguiente, existe un interés creciente en el desarrollo de compuestos, así como composiciones farmacéuticas y/o dietéticas, que se puedan utilizar para tratar enfermedades/trastornos mentales o para prevenir el desarrollo de enfermedades/trastornos mentales, tales como depresión y distimia en pacientes de riesgo, y para estabilizar el estado de ánimo.

15 Es sabido que un estado de ánimo desequilibrado se relaciona con una neurotransmisión deficiente, es decir, reducida, y que esto también conlleva una mayor sensibilidad al estrés.

20 De este modo, el estado de ánimo está influenciado por la biosíntesis de neurotransmisores, el procesamiento de neurotransmisores, el almacenamiento de neurotransmisores, la liberación de neurotransmisores, la recaptación de neurotransmisores y la unión del neurotransmisor al receptor, especialmente cuando el neurotransmisor es la serotonina. Un estado de ánimo desequilibrado se puede manifestar de por sí en animales, incluidos los humanos, en forma de tensión, tristeza, infelicidad/descontento, irritabilidad y disforia, y/o como una alteración en el comportamiento, las emociones y los procesos cognitivos.

Así pues, se necesitan también compuestos que armonicen o normalicen el estado de ánimo y que permitan conseguir un equilibrio emocional para poder hacer frente al estrés de la vida cotidiana y para mantener el rendimiento físico y psicológico.

25 Los trastornos del estado de ánimo y el estrés ocupacional también pueden provocar trastornos del sueño consecutivos (insomnio), retraso del comienzo del sueño y una baja calidad del sueño, así como alteraciones en los ritmos circadianos (denominados biorritmos). Estas afecciones suelen ser crónicas y pueden persistir durante mucho tiempo. El desequilibrio de los ritmos circadianos provocado por vuelos de larga distancia (defase horario), así como por el trabajo a turnos, también pueden provocar síntomas similares y angustia. Por consiguiente, el tratamiento con suplementos dietéticos para aliviar y prevenir los síntomas asociados con los trastornos del sueño, así como para mantener el ritmo circadiano normal (al que animales y humanos están acostumbrados) y/o para aliviar y prevenir los síntomas asociados con un ritmo circadiano alterado, tales como el deterioro de la función cognitiva y la memoria, la fatiga física y mental, somnolencia, garantiza la mejora de la calidad de vida global y beneficia la energía vital de la persona que la necesita.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

35 Sorprendentemente, se ha descubierto que ligustilide es un inhibidor eficaz de la recaptación de la serotonina y la noradrenalina, y un inhibidor de las monoaminoxidasas A y B. Por consiguiente, tiene unas propiedades similares a las de los fármacos antidepresivos comercializados actualmente, como los ISRS (inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina), los ISRN (inhibidores selectivos de la recaptación de la noradrenalina) y las aminas tricíclicas.

40 La presente invención se refiere especialmente al uso no terapéutico de ligustilide como agente equilibrador del estado de ánimo y mitigante del estrés, para el bienestar mental, así como para ayudar a reducir el riesgo de cambios bruscos en el estado de ánimo, para ayudar a mantener un estado de ánimo positivo y para sustentar el bienestar cognitivo, para normalizar el patrón del sueño (también denominado arquitectura del sueño), reducir el tiempo para el comienzo del sueño, en general para ayudar a promover y mantener una buena calidad del sueño; así como a composiciones (dietéticas) y bebidas/alimentos/comidas enriquecidos que lo contengan, y a sus usos.

45 Adicionalmente, el compuesto de la presente invención tiene aplicaciones veterinarias, que incluyen: prevenir el estrés en animales de granja durante la cría de ganado a gran escala y/o durante el transporte al matadero; prevenir la pérdida de calidad en la carne de los animales de granja durante el transporte al matadero; prevenir el picaje y el canibalismo entre las aves de corral; y reducir el estrés en los animales de compañía.

De acuerdo con la presente invención, esta demanda se satisface con ligustilide.

50 Por consiguiente, en un aspecto la invención se refiere al uso de ligustilide como agente equilibrador del estado de ánimo y/o mitigante del estrés en animales incluidos los humanos.

55 Los animales son especialmente humanos, mascotas o animales de compañía (preferentemente gatos y perros), animales de granja (preferentemente aves de corral, ganado bovino, ovejas, cabras y cerdos) y animales para la industria peletera, tales como visones, zorros y liebres, así como animales que se utilizan en acuicultura, tales como peces como el salmón y la trucha, así como crustáceos como las gambas.

- En una realización preferida de la presente invención, se utiliza ligustilide para prevenir el estrés en mascotas y animales de granja, en la cría de ganado a gran escala, durante el transporte al matadero y/o para prevenir pérdidas en la producción de leche o huevos y pérdidas en la calidad de la carne de dichos animales de granja durante el transporte al matadero.
- 5 En otra realización preferida de la presente invención, se utiliza ligustilide para prevenir el picaje y el canibalismo entre las aves de corral y/o para prevenir pérdidas en la calidad de la carne y en la producción de huevos que le acompañan y en general.
- En una realización preferida adicional de la presente invención, se utiliza ligustilide para mantener el ritmo circadiano en humanos, para aliviar y/o prevenir los síntomas asociados con un ritmo circadiano alterado en humanos. Por consiguiente, el estado de ánimo se estabiliza y se alcanza un equilibrio emocional para poder hacer frente al estrés de la vida cotidiana y para mantener el rendimiento físico y psicológico. Además, los síntomas asociados con un ritmo circadiano alterado, tales como el deterioro de la función cognitiva y la memoria, y la fatiga física y mental, se alivian y/o previenen, de manera que mejore la calidad de vida global y las personas a las cuales se les administran tales compuestos se benefician de mantener la energía vital. El desequilibrio de los ritmos circadianos provocado por vuelos de larga duración (defase horario), así como por el trabajo a turnos y los síntomas asociados con este, también pueden aliviarse y/o prevenirse.
- 10 15
- Por consiguiente, un estado de ánimo desequilibrado, que se puede manifestar en forma de tensión, tristeza, infelicidad/descontento e irritabilidad, disforia y/o una alteración en el comportamiento, las emociones y los procesos cognitivos, se puede prevenir mediante la administración de ligustilide a animales incluidos los humanos.
- 20 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de ligustilide para el tratamiento de un trastorno relacionado con la neurotransmisión deficiente o reducida o para la fabricación de una composición para el uso en el método de tratamiento de un trastorno relacionado con la neurotransmisión deficiente, particularmente para la fabricación de un antidepresivo, un reductor del comportamiento obsesivo-compulsivo, un relajante, un potenciador del sueño y/o un mitigante del insomnio, así como al uso no terapéutico como agente equilibrador del estado de ánimo, como potenciador de la vitalidad/el estado de ánimo, como mitigante del estrés, como potenciador del estado de salud y/o como reductor de la tensión, tristeza, infelicidad/descontento, irritabilidad y disforia.
- 25 En otro aspecto más, la invención se refiere a composiciones, particularmente composiciones dietéticas, que contienen ligustilide, así como composiciones farmacéuticas que contienen ligustilide y un vehículo farmacéutico convencional para utilizar en el tratamiento de trastornos relacionados con la neurotransmisión deficiente.
- 30 En el contexto de la presente invención, los animales incluyen humanos y engloban mamíferos, peces y pájaros. Los “animales” preferidos son humanos, mascotas o animales de compañía, animales de granja, animales para la industria peletera y animales que se utilizan en acuicultura. Los “animales” más preferidos son humanos, mascotas y animales de granja.
- Algunos ejemplos de mascotas son perros, gatos, pájaros, peces de acuario, cobayas, conejos, liebres y hurones.
- 35 Algunos ejemplos de animales de granja son peces (tales como, por ejemplo, salmón y trucha), animales de cultivo acuático (tales como, por ejemplo, gambas), cerdos, caballos, rumiantes (ganado bovino, ovejas y cabras) y aves de corral (tales como, por ejemplo, gansos, pollos, pollos de tipo broiler, gallinas ponedoras, codornices, patos, pavos).
- Algunos ejemplos de animales para la industria peletera son visones, zorros y liebres.
- 40 En una realización preferida de la presente invención, se utiliza ligustilide para prevenir el estrés en animales de granja, en la cría de ganado a gran escala, durante el transporte al matadero y/o para prevenir la pérdida de calidad de la carne de dichos animales de granja durante el transporte al matadero. Dichos animales de granja son especialmente aves de corral (tales como, por ejemplo, gansos, pollos de tipo broiler, gallinas ponedoras, codornices, patos, pollos, pavos), ganado bovino, ovejas, cabras y cerdos.
- 45 En otra realización preferida de la presente invención, se suministra ligustilide a mascotas para reducir el estrés, la tensión, la agresividad y el comportamiento compulsivo en condiciones estresantes tales como la separación, el cambio o pérdida de dueño, durante la separación por vacaciones y en la cría en los llamados “hoteles para animales”, la cría en protectoras de animales y otras condiciones de cría y reproducción concentradas.
- En otra realización preferida de la presente invención, se suministra ligustilide a aves de corral (tales como, por ejemplo, gansos, pollos de tipo broiler, gallinas ponedoras, codornices, patos, pollos, pavos) para prevenir el picaje y el canibalismo, los cuales provocan, por ejemplo, pérdidas en la calidad de la carne y la producción de huevos.
- 50 En una realización preferida más de la presente invención, se suministra ligustilide a humanos para mantener los ritmos circadianos en humanos, para aliviar y/o prevenir los síntomas asociados con un ritmo circadiano alterado en humanos.
- El término “ligustilide” también engloba cualquier material o extracto de una planta que contenga ligustilide, preferentemente en una cantidad de al menos el 50% en peso, más preferentemente en una cantidad de entre el 70 y el

90% en peso, aún más preferentemente en una cantidad de al menos el 90% en peso, en función del peso total del material o extracto vegetal. Los términos “material de una planta” y “material vegetal”, utilizados en el contexto de la presente invención, se refieren a cualquier parte de una planta.

5 Ligustilide se puede aislar mediante métodos conocidos en la técnica [remítase, por ejemplo, a Beck J. *et al.* 1995
Natural Products 58(7): 1047-1055] a partir de varias plantas, tales como *Angelica glauca*, *Angelica acutiloba*, *Angelica*
 10 *sinensis*, *Angelicae dahuricae*, *Apium graveolens*, *Ligusticum acutilobum*, *Ligusticum officinale*, *Ligusticum sinense*,
Ligusticum wallichii, *Ligusticum chuanxiong*, *Cnidium officinale*, *Rhizoma chuanxiong*, *Pleurospermum hookeri*,
Trachyspermum roxburghianum, *Meum athamanticum*, *Lomatium torreyi*, *Scutellaria baicalensis*, *Opopanax chironium*,
Cenolophium denudatum, *Coriandrum sativum* y *Silau silaus*. Por lo tanto, la expresión “ligustilide” también engloba
 cualquier extracto material o resina oleosa de estas plantas o cualquier otro material o extracto vegetal que contenga
 ligustilide, especialmente en una cantidad de al menos el 50% en peso, preferentemente en una cantidad de entre el 70
 y el 90% en peso, más preferentemente en una cantidad de al menos el 90% en peso, en función del peso total del
 material o extracto vegetal. Los compuestos utilizados en la presente también pueden ser de origen sintético. Un
 método preferido para la extracción a partir de *Ligusticum* es la extracción/destilación con fluido supercrítico.

15 Junto con el ligustilide puro especialmente preferido, están los materiales vegetales y los extractos vegetales que
 contienen al menos el 50% en peso, más preferentemente entre el 70 y el 90% en peso, aún más preferentemente al
 menos el 90% en peso, de este compuesto, en función del peso total del material/extracto vegetal. Los extractos de
 plantas enteras o de partes de estas, por ejemplo, hojas, raíces o semillas, se pueden adquirir de proveedores
 20 comerciales o bien se pueden obtener de acuerdo con los métodos ampliamente conocidos en la técnica utilizando
 disolventes como metanol, etanol, acetato de etilo, éter dietílico, *n*-hexano, cloruro de metileno o, preferentemente, con
 fluidos supercríticos como dióxido de carbono (puro o en una mezcla con otros disolventes tales como alcoholes) o
 óxido de dinitrógeno. A partir de los extractos, se pueden obtener compuestos únicos o mezclas más o menos puras
 mediante destilación y fraccionamiento, preferentemente a presión reducida. Como alternativa, ligustilide se puede
 sintetizar mediante métodos ampliamente conocidos en la técnica y se puede mezclar en cualquier cantidad deseada.

25 En una realización preferida de la presente invención, ligustilide se administra en forma de un destilado de *Ligusticum*,
 que contiene Z-ligustilide. Preferentemente, la cantidad de Z-ligustilide en el destilado/mezcla es de: una cantidad en el
 intervalo que oscila entre al menos el 30 y el 60% en peso; más preferentemente, al menos el 40% en peso, aún más
 preferentemente al menos el 50% en peso. Estas cantidades se expresan en función del peso total del destilado/mezcla.

30 Las composiciones dietéticas de acuerdo con la presente invención pueden contener además hidrocoloides protectores,
 aglutinantes, agentes formadores de película, agentes/materiales encapsuladores, materiales de pared/corteza,
 compuestos matriciales, agentes de recubrimiento, emulsionantes, agentes de superficie activa, agentes solubilizantes
 (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, vehículos, rellenos, co-compuestos, agentes dispersantes, agentes
 humectantes, promotores de procesamiento (disolventes), agentes fluidizantes, agentes enmascarantes del sabor,
 agentes de suplemento, agentes gelatinizantes, agentes gelificantes, antioxidantes y antimicrobianos.

35 La expresión “composiciones dietéticas” comprende cualquier tipo de nutrición, tal como comida/alimento y bebidas
 (enriquecidos), incluida también la nutrición clínica, así como también los suplementos dietéticos.

40 Además de un vehículo farmacéuticamente aceptable y al menos un compuesto de fórmula general I con las
 definiciones de X, R¹ - R⁵ y los preferidos según se ha descrito anteriormente, las composiciones farmacéuticas de
 acuerdo con la presente invención pueden contener aditivos farmacéuticos convencionales y adyuvantes, excipientes o
 diluyentes, que incluyen, sin carácter limitante, agua, gelatina de cualquier origen, gomas vegetales, sulfonato de
 lignina, talco, azúcares, almidón, goma arábiga, aceites vegetales, glicoles polialquilénicos, agentes saborizantes,
 conservantes, estabilizantes, agentes emulsificantes, tampones, lubricantes, colorantes, agentes humectantes, rellenos
 y similares. El vehículo puede ser un vehículo orgánico o inorgánico inerte adecuado para la administración
 oral/parenteral/inyectable.

45 Las composiciones farmacéuticas y dietéticas de acuerdo con la presente invención se pueden formular en cualquier
 forma galénica adecuada para administrar al cuerpo animal incluido el cuerpo humano, especialmente en cualquier
 forma que sea convencional para la administración oral, por ejemplo, en forma sólida tal como (aditivos/suplementos
 para) comida o alimento, premezcla de comida o alimento, comida o alimento enriquecido, comprimidos, pastillas,
 50 gránulos, grageas, cápsulas y formulaciones efervescentes tales como polvos o comprimidos; o en forma líquida tal
 como soluciones, emulsiones o suspensiones como, por ejemplo, bebidas, pastas y suspensiones oleosas. Las pastas
 se pueden usar como relleno de cápsulas de cubierta dura o blanda. Algunos ejemplos de otras formas de aplicación son
 las formas para la administración transdermal, parenteral o inyectable. Las composiciones dietéticas y farmacéuticas se
 pueden presentar en forma de formulaciones de liberación controlada (retrasada).

Algunos ejemplos de comida son productos lácteos tales como yogures.

55 Algunos ejemplos de comida enriquecida son barras de cereales, artículos de panadería tales como pasteles y galletas.

Las bebidas engloban bebidas alcohólicas y no alcohólicas, así como preparados líquidos para ser añadidos al agua
 potable y a la comida líquida. Las bebidas no alcohólicas son, por ejemplo, refrescos, bebidas deportivas, zumos de

frutas, limonadas, aguas de sabores (es decir, bebidas acuosas con bajo contenido calórico), té y bebidas lácteas. Las comidas líquidas son, por ejemplo, sopas y productos lácteos (por ejemplo, bebidas de muesli).

En el contexto de la presente invención, el “tratamiento” también engloba co-tratamiento, así como prevención. La “prevención” puede ser prevención de la primera incidencia (prevención primaria) o prevención de una reincidencia (prevención secundaria).

En el contexto de la presente invención, el término “trastorno” también engloba enfermedades.

Las composiciones farmacéuticas y dietéticas para el tratamiento de trastornos relacionados con la neurotransmisión deficiente engloban su uso como antidepresivos, potenciadores del estado de ánimo/vitalidad, mitigantes del estrés, potenciadores del estado, reductores de la ansiedad y reductores del comportamiento obsesivo-compulsivo, relajantes, potenciadores del sueño y/o mitigantes del insomnio, normalizadores del ritmo circadiano (biorritmo). Todas ellas pueden mejorar, promover y apoyar la neurotransmisión psicológica, especialmente en el sistema nervioso central y, por lo tanto, pueden mitigar la disfunción mental.

Los antidepresivos son fármacos para tratar trastornos mentales, del comportamiento y emocionales/afectivos, neuróticos, neurodegenerativos, alimenticios y relacionados con el estrés, tales como, por ejemplo, depresión unipolar, depresión bipolar, depresión grave, depresión crónica, depresión subcrónica, distimia, depresión posparto, disforia/síndrome premenstrual (SPM), síntomas depresivos climactericos, agresión, trastornos de déficit de atención (TDA), trastornos de ansiedad social, trastornos afectivos estacionales, (trastornos de) ansiedad tal(es) como el trastorno de ansiedad generalizada (TAG), síndrome de fibromialgia, fatiga crónica, trastornos del sueño (insomnio), trastornos de estrés postraumático, trastornos de pánico, trastornos obsesivo-compulsivos, síndrome de la pierna inquieto, nerviosismo, cefaleas primarias/migraña y dolor en general, emesis, bulimia, anorexia nerviosa, síndrome del atracón, trastornos gastrointestinales, síndrome de agotamiento profesional, irritabilidad y cansancio.

Los antidepresivos también se pueden utilizar para (la fabricación de composiciones para) la prevención primaria y secundaria y/o el tratamiento del deterioro neurocognitivo. Además, también son eficaces en el tratamiento de síntomas depresivos u otros síntomas relacionados con un trastorno en la neurotransmisión que ocurran como una comorbosidad en enfermedades crónicas tales como enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares, cáncer, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y otras.

El ligustilide, así como (mezclas de) materiales vegetales y extractos vegetales que contengan (esencialmente) dicho ligustilide (especialmente en una cantidad de al menos el 30% en peso, preferentemente en una cantidad de al menos el 50% en peso, más preferentemente en una cantidad de entre el 70 y el 90% en peso, de la forma más preferida en una cantidad de al menos el 90% en peso, en función del peso total del material o extracto vegetal) y composiciones farmacéuticas/dietéticas que los contengan son adecuados para el tratamiento de animales incluidos los humanos.

Especialmente los animales de compañía (mascotas) y el ganado (de granja) pueden encontrarse en unas condiciones en las que necesiten una neurotransmisión mejorada o aumentada. Tales condiciones, por ejemplo, ocurren después de la captura o el transporte o en la estabulación, cuando los animales desarrollan trastornos análogos y se encuentran angustiados o agresivos, o muestran un comportamiento estereotípico, o ansiedad y comportamiento obsesivo-compulsivo.

Las expresiones “potenciador del estado de ánimo” o “reforzador del bienestar emocional” o “potenciador de la vitalidad” se refieren a que el estado de ánimo de una persona tratada con este mejora, que la autoestima aumenta y/o que los pensamientos negativos y/o la tensión negativa se reduce. También se refieren a que las emociones se estabilizan y/o que el bienestar general, especialmente el mental, y la vitalidad se mejoran o se mantienen, así como que (se contribuye a que) se reduzca el riesgo de cambios bruscos en el estado de ánimo y (se contribuye a que) se mantenga un estado de ánimo positivo.

Se puede suministrar ligustilide en general como un reductor de la ansiedad y/o un reductor del comportamiento obsesivo-compulsivo a animales incluidos los humanos, preferentemente a humanos, mascotas y animales de granja.

La expresión “reductor de la ansiedad” se refiere a que la tensión crónica y la preocupación y la tensión ansiosas se calman y se mitigan. Se mitiga el síndrome de hipervigilancia, incluida la inquietud, la tensión muscular y los problemas del sueño. Se resuelven las fobias sociales y otras fobias. En general, el entorno social se ve menos amenazador. La persona se encuentra relajada emocionalmente, experimenta confort y disfruta de la compañía y el contacto con otra gente.

La expresión “relajante” o “potenciador del sueño” o “mitigante del insomnio” se refiere a que se potencia el comienzo del sueño (se reduce el tiempo para conciliar el sueño, tiempo de retraso del sueño) y se ayuda a la persona a conciliar fácilmente el sueño, normalizar los patrones del sueño o mantener un sueño ininterrumpido durante toda la noche. También se refiere a que se corrigen las alteraciones del sueño asociadas al ritmo circadiano debidas al desfase horario o el trabajo a turnos, y que se previenen y se eliminan los síntomas asociados con el insomnio, es decir, el deterioro de la función cognitiva y la memoria, la fatiga física y mental, la somnolencia, y se mejora la calidad de vida global y la energía vital.

El ligustilide, así como las composiciones que comprenden una dosis eficaz de este, son útiles para el tratamiento, la prevención y el alivio de los síntomas relacionados con el estrés, para el tratamiento, la prevención y el alivio de los síntomas relacionados con la sobrecarga laboral, el cansancio y/o agotamiento profesional, para el aumento de la resistencia o tolerancia al estrés y/o para favorecer y facilitar la relajación en individuos normales y saludables, es decir, tales composiciones tienen un efecto "mitigante del estrés".

Una realización adicional de la presente invención se refiere al uso de ligustilide y al uso de composiciones que lo contienen (materiales/extractos vegetales, composiciones farmacéuticas/dietéticas) como un "potenciador del estado", es decir, se refiere a que reduce la irritabilidad y el cansancio, reduce o previene o alivia la fatiga física y mental, y aumenta la energía en términos más generales, especialmente aumenta la producción de energía cerebral, en individuos enfermos o sanos. Además, para la mejora cognitiva en general, y especialmente para el mantenimiento o la mejora de la atención y la concentración, de la memoria y de la capacidad de recordar, de la habilidad de aprendizaje, del procesamiento de la lengua, de la resolución de problemas y del funcionamiento intelectual; para la mejora de la memoria a corto plazo; para la mejora de la alerta y la agudeza mental, la capacidad de concentración; para aumentar la vigilancia mental; para reducir la fatiga mental; para apoyar el bienestar cognitivo, para mantener una función cognitiva equilibrada, para la regulación del apetito y la saciedad, así como para la regulación de la actividad motriz.

Una dosis diaria de *ligusticum* adecuada para humanos a los efectos de la presente invención puede encontrarse dentro del intervalo que oscila entre 0,001 mg por kg de peso corporal y aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal por día. Se prefiere más una dosis diaria de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal, y se prefiere especialmente una dosis diaria de aproximadamente 0,05 a 5,0 mg por kg de peso corporal. La cantidad de un material vegetal o extracto vegetal que contenga *ligusticum* se puede calcular correspondientemente.

En las preparaciones sólidas de dosis unitaria para humanos, el *ligusticum* se encuentra presente de forma adecuada en una cantidad de entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 1000 mg, preferentemente entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg por dosis unitaria.

En composiciones dietéticas, especialmente en comidas y bebidas para humanos, el *ligusticum* se encuentra presente de forma adecuada en una cantidad de entre aproximadamente el 0,0001 (1 mg/kg) y aproximadamente el 5% en peso (50 g/kg), preferentemente entre aproximadamente el 0,001% (10 mg/kg) y aproximadamente el 1% en peso (10 g/kg), más preferentemente entre aproximadamente el 0,01 (100 mg/kg) y aproximadamente el 0,5% en peso (5 g/kg), en función del peso total de la comida o bebida.

En comidas y bebidas de una realización preferida de la invención, la cantidad de *ligusticum* es de 10 a 30 mg por ración, es decir, 120 mg por kg de comida o bebida.

Una dosis diaria de *ligusticum* adecuada para animales, excluidos los humanos, a los efectos de la presente invención puede encontrarse dentro del intervalo que oscila entre 0,001 mg por kg de peso corporal y aproximadamente 1000 mg por kg de peso corporal por día. Se prefiere más una dosis diaria de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal, y se prefiere especialmente una dosis diaria de aproximadamente 1 mg a 100 mg por kg de peso corporal.

Para los animales de compañía (mascotas), son adecuadas las mismas dosis diarias que para los humanos.

La invención se ilustra con más detalle en los ejemplos a continuación.

Ejemplos

La 3-*n*-butilftalida utilizada en los experimentos que se describen a continuación se adquirió de Advanced Synthesis, PO Box 437920, San Ysidro, CA 92173. Las senkyunolidas y el cnidilide se adquirieron de AnalytiCon Discovery GmbH, Hermannswerder Haus 17, 14473 Potsdam, Alemania, y el ligustilide fue sintetizado por los químicos de DSM Nutritional Products Ltd., Kaiseraugst, Suiza. Todos los compuestos tenían una pureza > 95%.

Ejemplo 1:

Inhibición de la recaptación de serotonina y desplazamiento del citalopram marcado por compuestos de fórmula I

Las células HEK-293, que expresan establemente el transportador de la recaptación de la serotonina humana (hSERT), se obtuvieron de R. Blakely, Vanderbilt University, EE. UU. Las células se cultivaron rutinariamente en un medio de Eagle modificado por Dulbecco, que se adquirió de Bioconcept, Allschwil, Suiza, que contenía un 10% de suero fetal de ternera, penicilina, estreptomycin, L-glutamina y el antibiótico G418 y se pasaron por tripsinización. Las células se sembraron en el medio mencionado anteriormente un día antes del ensayo. Inmediatamente antes del ensayo, se reemplazó el medio por el tampón de bicarbonato de Krebs Ringers, adquirido de Sigma Chemicals Ltd., complementado con 35 μ M de pargilina, 2,2 mM de CaCl₂, 1 mM de ácido ascórbico y 5 mM de ácido *N*-2-hidroxiethylpiperazin-*N'*-2-etanosulfónico (tampón denominado "Hepes"). La recaptación de la serotonina en las células se determinó mediante la adición de serotonina radiomarcada (3H) (Amersham Biosciences GE Healthcare, Slough, Reino Unido) a una concentración de 20 nM y la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras eliminar el

marcador no incorporado lavando cuidadosamente tres veces con el tampón mencionado anteriormente, la serotonina incorporada se cuantificó mediante contador de centelleo líquido.

El efecto de los compuestos de Fórmula I en la recaptación de la serotonina se determinó mediante su inclusión en el ensayo en un intervalo de concentraciones entre 0.03 y 100 μM 10 minutos antes y durante la adición de serotonina / citalopram (3H). La recaptación de la serotonina a través del transportador fue inhibida por ligustilide, 3-butiltalida, senkyunolida A, senkyunolida C, senkyunolida B y cnidilide, respectivamente, de forma dependiente de la dosis, con los valores de CI_{50} que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Inhibición de la recaptación de la serotonina en células HEK-293 transfectadas mediante compuestos de fórmula I.

Sustancia	CI_{50} para la recaptación de la serotonina tritiada
Ligustilide	20.4 +/- 5.8 μM (n=4)
3- <i>n</i> -butiltalida	35.2 +/- 6.7 μM (n=3)
Senkyunolida A	32.5 +/- 9.1 μM (n=2)
Senkyunolida C	31.4 +/- 10.9 μM (n=2)
Senkyunolida B	75.0 +/- 11.0 μM (n=2)
Cnidilide	40.5 +/- 15.0 μM (n=3)
Extracto de apio	99.2 +/- 5.8 $\mu\text{g/ml}$ (n=2)
Extracto de apio salvaje	29.9 +/- 8.3 $\mu\text{g/ml}$ (n=2)

Debido a que los experimentos se llevaron a cabo dos veces o más (n), se muestra el valor medio +/- el error estándar de la media (s.e.m., por sus siglas en inglés).

Ejemplo 2: Inhibición de la monoaminoxidasa por compuestos de fórmula I

Las aminas orgánicas *p*-tiramina o bencilamina se utilizaron como sustratos para las enzimas Monoamino oxidasa A (MAO-A) y B (MAO-B), respectivamente. El H_2O_2 producido en esta reacción se cuantificó mediante la reacción con el ácido vanílico, catalizada por la peroxidasa del rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés).

Las reacciones se llevaron a cabo en placas de microlitros de poliestireno. Las enzimas MAO (concentración final de 2 U/ml) se mezclaron con *p*-tiramina (Sigma, concentración final de 0.5 mM) o bencilamina (Sigma, concentración final de 0.5 mM), según resulte apropiado, y la solución cromogénica (que contenía ácido vanílico (Fluka), 4-aminoantipirina (Fluka) y peroxidasa del rábano picante (Sigma), concentraciones finales de 0.25 mM, 0.125 mM y 1 U/ml, respectivamente) en un tampón de fosfato de potasio 0.2 M de pH 7.6. Las reacciones se monitorizaron con un lector de absorbancia de placas de microlitros, por ejemplo, Spectramax M5 (Molecular Devices Corporation). Las lecturas de absorbancia se registraron a 495 nm cada 15 segundos durante 40 minutos y se calcularon las velocidades iniciales de reacción mediante regresión lineal utilizando SOFTmaxPro (Molecular Devices Corporation).

El efecto de ligustilide, 3-butiltalida, senkyunolida C y cnidilide en las enzimas de monoamino oxidasa se determinó mediante su inclusión en el ensayo en un intervalo de concentraciones entre 0.03 y 100 μM 10 minutos antes y durante la incubación con el sustrato. Para determinar el efecto de los compuestos en la porción de la reacción catalizada por el HRP, se reemplazó la enzima MAO por H_2O_2 (Molecular Probes, concentración final de 0.2 mM). Las reacciones que contenían MAO-A y MAO-B fueron ambas inhibidas por diterpenos tricíclicos y sus derivados de acuerdo con la fórmula I de forma dependiente de la dosis, mientras que la reacción de control no resultó afectada. Los valores de CI_{50} registrados para la inhibición de la actividad de la monoamino oxidasa por ligustilide, 3-butiltalida, senkyunolida C y cnidilide, respectivamente, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Inhibición de MAO-A y MAO-B por compuestos de fórmula I.

Sustancia	CI_{50} [μM] para la inhibición de MAO-A	CI_{50} [μM] para la inhibición de MAO-B
Ligustilide	15.7 +/- 0.2 s.e.m. n=2	24.9 +/- 3.7 s.e.m. n=2
3- <i>n</i> -butiltalida	8.1 +/- 1.2 s.e.m. n=2	56.1 +/- 10.2 s.e.m. n=2
Senkyunolida C	2.72 +/- 0.16 s.e.m. n=2	2.14 +/- 0.24 s.e.m. n=2
Cnidilide	> 100 μM n=2	108.8 +/- 17.7 s.e.m. n=2

Ejemplo 3: Efecto de los compuestos de fórmula I en la prueba de observación primaria (Irwin) en ratones

El método, que detecta la primera dosis tóxica, el intervalo de dosis activa y los efectos principales de una sustancia de prueba en el comportamiento y la función fisiológica, sigue el descrito por Irwin, 1968 *Psychopharmacology*, 13:222-257.

Se suministró la sustancia de prueba (3-*n*-butilftalida, ligustilide) a los ratones y estos se observaron en comparación simultánea con un grupo de control al que se suministró un vehículo (condiciones no ciegas). Se compararon 3 grupos tratados con el mismo control en cada momento dado. Todos los animales dentro de un grupo de tratamiento se observaron simultáneamente.

Se registraron las modificaciones en el comportamiento, los síntomas fisiológicos y de neurotoxicidad, el diámetro de la pupila y la temperatura rectal, de acuerdo con una cuadrícula de observación estandarizada derivada de la de Irwin, *supra*. La cuadrícula contiene los siguientes términos: mortalidad*, convulsiones*, temblores*, Straub*, sedación, excitación, modo de andar anormal* (balanceándose, de puntillas), saltos*, descoordinación motora*, retorcerse*, piloerección*, estereotipias* (oler, mascar, movimientos de la cabeza), tics en la cabeza*, rascarse*, respiración*, agresividad*, miedo, reacción al contacto, tono muscular, pérdida del reflejo de enderezamiento, ptosis, exoftalmos, pérdida de prensión, aquinesia, catalepsia, pérdida de tracción, pérdida de reflejo corneal, analgesia, defecación, salivación, lagrimación, diámetro de la pupila (Unidad = 1/45 mm) y temperatura rectal.

Se realizaron observaciones a los 15, 30, 60, 120 y 180 minutos después de la administración de la sustancia de prueba y también 24 horas después. Los síntomas marcados con (*) se observaron continuamente desde 0 hasta 15 minutos después de la administración. Se estudiaron 5 ratones por grupo.

Se solubilizó 3-butilftalida (pureza del 98.5%) en 3% de DMSO, 3% de Tween 80 en solución salina (0.9% p/v de NaCl) y se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal.

Resultados**3-*n*-butilftalida**

A 100 mg/kg de peso corporal, la 3-*n*-butilftalida presentó efectos sedantes leves (en 5/5 ratones después de 15 y 30 minutos, y en 2/5 a los 60 minutos) y tono muscular reducido (en 5/5 ratones después de 15 y 30 minutos, y en 3/5 ratones después de 60 minutos).

A 200 mg/kg de peso corporal, presentó efectos sedantes moderados (en 5/5 ratones después de 60 y 120 minutos), miedo reducido y tono muscular reducido después de 60 minutos.

A 300 mg/kg de peso corporal, presentó sedación marcada en 4/4 ratones después de 15 y 30 minutos, sedación moderada en 4/4 ratones a los 60 minutos y 120 minutos, y sedación leve en 4/4 ratones a los 180 minutos.

A 300 mg/kg de peso corporal, la 3-butilftalida también redujo el miedo y el tono muscular a los 120 minutos.

En conjunto, la 3-butilftalida presentó un efecto sedante, reductor del miedo y relajante muscular, dependiente de la dosis.

Ligustilide (pureza del 98.9%) a 30 mg/kg indujo sedación leve en 3 ratones a los 30 minutos.

A 100 mg/kg, indujo sedación leve en los 5 ratones desde 15 hasta 30 minutos y en 3 ratones a los 60 minutos; redujo el tono muscular en 2 ratones a los 30 minutos.

A 200 mg/kg la sedación fue de leve a moderada en los 5 ratones desde 15 hasta 120 minutos y leve en 2 ratones a los 180 minutos; redujo el tono muscular en los 5 ratones a los 15 minutos, en 4 ratones desde 30 hasta 60 minutos, en 2 ratones a los 120 minutos y en 1 ratón a los 180 minutos. A 300 mg/kg la sedación fue moderada en los 5 ratones desde 15 hasta 60 minutos y leve desde 120 hasta 180 minutos; redujo el tono muscular en los 5 ratones desde 15 hasta 30 minutos, en 4 ratones desde 60 hasta 120 minutos y en 3 ratones a los 180 minutos.

En conjunto, la 3-*n*-butilftalida y el ligustilide presentaron un efecto sedante y relajante muscular, dependiente de la dosis.

Ejemplo 4: Prueba de natación de Porsolt con 3-*n*-butilftalida y ligustilide

La "Prueba de desesperación conductual" o "Prueba de natación forzada de Porsolt" es un modelo animal validado para la depresión (remítase a T. Nagatsu 2004 *Neuro Toxicology*, 25:11-20 y Porsolt *et al.* 1977, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 229:327-336). Responde a la mejora de la transmisión de varios neurotransmisores, incluida la serotonina, dopamina y noradrenalina.

La prueba, que detecta la actividad antidepresiva, se llevó a cabo según describe Porsolt *et al. supra*. Los ratones forzados a nadar en una situación de la cual no pueden escapar rápidamente se vuelven inmóviles. Los antidepresivos reducen la duración de la inmovilidad.

Los ratones se colocaron individualmente en un cilindro (Altura = 24 cm, Diámetro = 13 cm) que contenía 10 cm de agua (22 °C) del cual no podían escapar. Los ratones se colocaron en el agua durante 6 minutos y se midió la duración de la inmovilidad durante los últimos 4 minutos.

5 Se estudiaron 10 ratones por cada uno de los cuatro grupos. La prueba se realizó a ciegas, es decir, la persona que llevó a cabo el experimento fue distinta de la persona que inyectó a los ratones y, por lo tanto, no sabía a cuál de los cuatro grupos pertenecía cada ratón.

10 La 3-*n*-butilftalida (pureza del 98.5%) se evaluó en 3 dosis cada vez: a 10, 30 y 80 mg/kg de peso corporal, se administró por vía intraperitoneal 30 minutos antes de la prueba y se comparó con un grupo de control. La 3-*n*-butilftalida administrada de este modo se disolvió en una solución salina que contenía el 3% en peso de DMSO y el 3% en peso de Tween® 80 (denominada "vehículo"). Al grupo de control, el vehículo que consistía en la solución salina que contenía el 3% en peso de DMSO y el 3% en peso de Tween® 80 se administró por vía intraperitoneal.

Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Reducción del "tiempo de inmovilidad" con 3-*n*-butilftalida.

Grupo	Concentración de 3- <i>n</i> -butilftalida [mg/kg de peso corporal]	Duración de la inmovilidad [segundos] ± Error estándar de la media
Grupo 1	0 (grupo de control)	157.4 ± 13.2
Grupo 2	10	132.4 ± 9.3
Grupo 3	30	128.0 ± 15.3
Grupo 4	80	129.0 ± 15.4

15 Entre 10 y 80 mg/kg, la 3-*n*-butilftalida presentó una tendencia a reducir el tiempo de inmovilidad en aproximadamente el 18%.

Tabla 5: Reducción del "tiempo de inmovilidad" con ligustilide.

Grupo	Concentración de ligustilide [mg/kg de peso corporal]	Duración de la inmovilidad [segundos] ± Error estándar de la media
Grupo 1	0 (grupo de control)	158.7 ± 10.1
Grupo 2	10	128.9 ± 15.1
Grupo 3	30	164.2 ± 15.5
Grupo 4	80	147.1 ± 12.1

20 A 10 mg/kg, el ligustilide presentó una tendencia a reducir el tiempo de inmovilidad en aproximadamente el 18%, pero no a concentraciones más elevadas.

Ejemplo 5: Prueba del laberinto en cruz elevado con 3-*n*-butilftalida

El método, que detecta la actividad ansiolítica, sigue el descrito por Handley *et al.*, 1984 (*Naunyn-Schm Arch Pharm* 387:1-5). Los roedores evitan los espacios abiertos (los brazos abiertos de un laberinto en cruz elevado). Los ansiolíticos aumentan la actividad exploradora en los brazos abiertos.

25 El laberinto consiste en 4 brazos de la misma longitud y anchura (14 x 5 cm) dispuestos en forma de un signo más (+). Dos brazos opuestos están rodeados por paredes de 12 cm de altura (brazos cerrados). Los otros dos brazos no tienen paredes (brazos abiertos). El laberinto se levanta a 56 cm del suelo. Se sitúa un ratón en el centro del laberinto cruzado y se deja que explore durante 5 minutos. Se registra el número de entradas en los brazos abiertos y cerrados y el tiempo que pasa en los brazos abiertos. Se estudiaron 10 ratones por grupo. La prueba se llevó a cabo a ciegas.

30 Se probó la 3-*n*-butilftalida a dosis de 10, 30 y 80 mg/kg de peso corporal.

Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6:

TRATAMIENTO (mg/kg) Vía oral - 24 h, 5 h y 1 h antes de la prueba	BRAZO ABIERTO Número de entradas		BRAZO ABIERTO Tiempo transcurrido (s)	
	Media \pm sem	% cambio	Media \pm sem	% cambio
Vehículo	2.4 \pm 0.5	-	18.2 \pm 4.9	-
3- <i>n</i> -butilftalida (10)	3.5 \pm 0.7	+46%	24.3 \pm 4.6	+34%
3- <i>n</i> -butilftalida (30)	3.1 \pm 0.5	+29%	23.0 \pm 3.8	+26%
3- <i>n</i> -butilftalida (80)	3.0 \pm 0.8	+25%	26.4 \pm 5.3	+45%

La 3-*n*-butilftalida presentó una tendencia a aumentar moderadamente el número de entradas y el tiempo transcurrido en el brazo abierto. No tuvo efecto en las entradas en el brazo cerrado. Por lo tanto, la 3-*n*-butilftalida tiene una actividad ansiolítica moderada.

Ejemplo 6: Prueba de enterramiento de esferas como prueba para el comportamiento obsesivo-compulsivo o de tipo ansioso

Se evaluó un extracto de aceite de las semillas del apio rico en ftalidas en la prueba de enterramiento de esferas. Se adquirió un extracto crudo del aceite de las semillas del apio (*Apium graveolens*), el cual se obtuvo mediante extracción con fluido supercrítico de CO₂ de las semillas, de Guanzhou Honsea Sunshine Bio Science & Technology, Guangzhou, 510620, República Popular de China. Este extracto (66.15 g) se destiló durante aproximadamente 2 horas en un Kugelrohr de aproximadamente 30 cm a una temperatura de 125 °C y a una presión de 0.02 mbar. El destilado contenía el 18.12% de butilftalida, el 0.87% de butilidenftalida, el 35.37% de senkyunolida, el 20.99% de sedanolida, el 2.23% de ácido graso C16 y el 3.14% de ácido oleico, en función del peso total del extracto de aceite de las semillas del apio.

El comportamiento de "enterramiento defensivo" se demostró mediante el enterramiento de objetos nocivos por parte de las ratas, tales como bebederos llenos de un líquido de sabor desagradable (Wilkie *et al.* 1979 *J Exp Anal Behav.* 31:299-306), o pulsos eléctricos (Pinel *et al.* 1978, *J Comp and Physiol Psych* 92:708-712).

Se ha descrito que el comportamiento de enterramiento de esferas es sensible a un intervalo de tranquilizantes secundarios (por ejemplo, diazepam) y principales (por ejemplo, haloperidol) (Broekkamp *et al.* 1986 *Eur J Pharmacol.* 126:223-229), y también a los ISRS (por ejemplo, fluvoxamina, fluoxetina, citalopram), antidepresivos tricíclicos (por ejemplo, imipramina, desipramina) e inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina (por ejemplo, reboxetina), en dosis que no inducen sedación. El modelo puede reflejar tanto el comportamiento obsesivo-compulsivo como el de tipo ansioso (remítase a De Boer *et al.* 2003 *Eur J Pharmacol* 463:145-161).

La prueba de enterramiento de esferas se llevó a cabo en jaulas de Tipo II (16 x 22 cm), las cuales se llenaron con material común para el lecho de roedores, hasta una profundidad de 4 cm, y dicho material se allanó cuidadosamente de forma manual para obtener una superficie uniforme. Se colocaron doce esferas en la superficie de dicho material, en una configuración 3 x 4, espaciadas de manera uniforme.

Al inicio de la prueba, los ratones se colocaron individualmente en las jaulas de prueba y se dejó que exploraran durante 30 minutos. Al final de la prueba, se retiraron los ratones de las jaulas y se contó el número de esferas que habían enterrado (es decir, al menos cubiertas 2/3 partes con el material para el lecho). Antes de someter los animales siguientes a la prueba, se preparan jaulas y material para el lecho nuevos.

Se evaluó el extracto de aceite de las semillas del apio después de la administración oral subcrónica a 50, 100, 200, 300 mg/kg con fluoxetina a 10 mg/kg como sustancia de referencia y aceite de maíz como vehículo. El extracto de aceite de las semillas del apio, la fluoxetina y el vehículo se administraron oralmente por medio de una sonda nasogástrica a las 24, -5, -1 h antes de la prueba.

Después de cada dosis, los ratones se devolvieron a sus jaulas casa hasta la siguiente dosis o el inicio de la prueba.

Resultados

Tabla 7: Efectos del extracto de aceite de las semillas del apio (*Apium graveolens*) y la fluoxetina en la prueba de enterramiento de esferas en ratones.

TRATAMIENTO (mg/kg) Vía oral, -24, -5, -1 h	PRUEBA DE ENTERRAMIENTO DE ESFERAS
	% ESFERAS ENTERRADAS
<i>Apium graveolens</i> (50)	-16%
<i>Apium graveolens</i> (100)	-4%
<i>Apium graveolens</i> (200)	-45%
<i>Apium graveolens</i> (300)	-37%
Floxetina (10)	-78%

- 5 El extracto de aceite de las semillas del apio presentó una tendencia a reducir el número de esferas cubiertas en comparación con el vehículo de control. El efecto fue casi la mitad del presentado por el inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina fluoxetina.

Ejemplo 7: Inhibición de la recaptación de dopamina por compuestos de fórmula I

- 10 Las acciones de varios neurotransmisores, incluida la dopamina, se regulan a través de su rápida recaptación y evacuación de las uniones sinápticas mediante proteínas transportadoras de membrana plasmática. El transportador de dopamina en las neuronas dopaminérgicas centrales es responsable de la recuperación de hasta el 90% del transmisor liberado. Los transportadores de monoamina son objetivos de gran afinidad para una serie de agentes psicoactivos, tales como la cocaína, la amfetamina y los antidepresivos. Estos agentes, mediante el bloqueo de los transportadores y consecuentemente la prevención de la recaptación neuronal, elevan los niveles de las concentraciones extracelulares del neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico, lo cual contribuye a sus efectos autonómicos y de comportamiento.

- 15 Las células CHO-Ki/hDAT que expresan el transportador humano de dopamina (hDAT) se colocaron en las placas antes del ensayo. Las células (2×10^5 /ml) se incubaron con el compuesto de fórmula I (3-*n*-butilftalida) y/o el vehículo en un tampón de Tris-HEPES modificado de pH 7.1 a 25 °C durante 20 minutos antes de añadir Dopamina[³H] 50 nM durante 20 minutos. La señal específica se determinó en presencia de nomifensina 10 µM. A continuación, las células se solubilizaron con un tampón de lisis al 1% de SDS. La reducción de la recaptación de Dopamina[³H] en un 50 por ciento o más ($\geq 50\%$) con relación a los controles de vehículo indica una actividad inhibidora significativa. Los compuestos se evaluaron a 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 µM. Estas mismas concentraciones se aplicaron simultáneamente a un grupo separado de células no tratadas y se evaluaron para determinar una posible citotoxicidad inducida por el compuesto solamente cuando se observó una inhibición de la recaptación significativa.

Compuesto	CI ₅₀
*Nomifensina	11 nM
3- <i>n</i> -Butilftalida	22.0 µM

* Indica el uso de un agente estándar de referencia.

Referencias:

- 30 Giros, 1992 *Mol. Pharmacol.* 42:383-390, 1992.
Pristupa *et al.* 1994 *Mol. Pharmacol.* 45:125-135.

Ejemplo 8: Inhibición de la recaptación de norepinefrina por compuestos de fórmula I

- 35 Las acciones de varios neurotransmisores, incluida la norepinefrina, se regulan a través de su rápida recaptación y evacuación de las uniones sinápticas mediante proteínas transportadoras de membrana plasmática. El transportador de norepinefrina en las neuronas adrenérgicas centrales es responsable de la recuperación de hasta el 90% del transmisor liberado. Los transportadores de monoamina son objetivos de gran afinidad para una serie de agentes psicoactivos, tales como la cocaína, la amfetamina y los antidepresivos. Estos agentes, mediante el bloqueo de los transportadores y consecuentemente la prevención de la recaptación neuronal, elevan los niveles de las concentraciones extracelulares del neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico, lo cual contribuye a sus efectos autonómicos y de comportamiento.

Las células MDCK de riñón canino que expresan establemente el transportador humano recombinante de norepinefrina se colocaron en las placas un día antes del ensayo. Las células (2×10^5 /ml) se preincubaron con el compuesto de fórmula I (3-*n*-butilftalida) y/o el vehículo en un tampón de Tri-HEPES modificado de pH 7.1 a 25 °C durante 20 minutos, a continuación se añadió Norepinefrina[3 H] 25 nM durante 10 minutos de incubación. A continuación, las células en los pocillos se enjuagaron dos veces, se solubilizaron con un tampón de lisis al 1% de SDS y se analizó la mezcla resultante de la lisis para determinar la recaptación de Norepinefrina[3 H]. La señal específica se determinó en presencia de desipramina 10 μ M. La reducción de la recaptación de Norepinefrina[3 H] en un 50 por ciento o más ($\geq 50\%$) con relación a los controles de vehículo indica una actividad inhibitora significativa. Los compuestos se evaluaron a 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 μ M. Estas mismas concentraciones se aplicaron simultáneamente a un grupo separado de células no tratadas y se evaluaron para determinar una posible citotoxicidad inducida por el compuesto solamente cuando se observó una inhibición de la recaptación significativa.

Datos de referencia:

Inhibidor	CI ₅₀
*Desipramina	1.9 nM
3- <i>n</i> -Butilftalida	23.7 μ M

* Indica el uso de un agente estándar de referencia.

* El experimento se llevó a cabo dos veces.

Referencia:

Galli *et al.* 1995 *J. Exp. Biol.* 198:2197-2212.

Ejemplo 9: Preparación de una cápsula de gelatina blanda

Se puede preparar una cápsula de gelatina blanda (500 mg) que comprenda los siguientes ingredientes:

Ingrediente	Cantidad por cápsula
Extracto de aceite de semillas de apio	500 mg
Lecitina	50 mg
Aceite de soja	250 mg

Se pueden administrar dos cápsulas por día durante 3 meses a un adulto humano para el tratamiento de la distimia crónica leve.

Ejemplo 10: Preparación de una cápsula de gelatina blanda

Se puede preparar una cápsula de gelatina blanda (600 mg) que comprenda los siguientes ingredientes:

Ingrediente	Cantidad por cápsula
Extracto de aceite de semillas de apio	200 mg
Aceite de onagra	300 mg
Vitamina B ₆	100 mg

Se puede tomar una cápsula por día, preferentemente en la segunda mitad del ciclo menstrual, durante 14 días para el tratamiento del síndrome premenstrual y el trastorno disfórico premenstrual.

Ejemplo 11: Preparación de un comprimido

Se puede preparar un comprimido de 400 mg que comprenda los siguientes ingredientes:

Ingrediente	Cantidad por comprimido
3- <i>n</i> -butilftalida	100 mg
Extracto estandarizado de <i>Passiflora</i>	150 mg
Extracto de té verde, p.ej. TEAVIGO® de DSM Nutritional Products, Kaiseraugst, Suiza	150 mg

Se puede tomar un comprimido dos veces al día durante 3 meses para alcanzar bienestar general, energizarse y aliviar el estrés.

Ejemplo 12: Preparación de un refresco instantáneo con sabor

Ingrediente	Cantidad (g)
3- <i>n</i> -butilftalida	0.9
Sacarosa, polvo fino	922.7
Ácido ascórbico, polvo fino	2.0
Ácido cítrico anhidro en polvo	55.0
Sabor de limón	8.0
Citrato de trisodio anhidro en polvo	6.0
Fosfato de tricalcio	5.0
β-caroteno 1% CWS de DNP AG, Kaiseraugst, Suiza	0.4
Cantidad total	1000

- 5 Se mezclan todos los ingredientes y se pasan por un tamiz de 500 μm. El polvo resultante se introduce en un recipiente adecuado y se mezcla en una mezcladora turbular durante al menos 20 minutos. Para preparar la bebida, se toman 125 g del polvo mezclado obtenido y se añade agua hasta obtener un litro de bebida.

El refresco listo para beber contiene aproximadamente 30 mg de 3-*n*-butilftalida por unidad (250 ml).

Se pueden beber 2 unidades por día (240 ml) como un reforzante y para alcanzar un bienestar general.

10 **Ejemplo 13: Preparación de una barra de cereales enriquecida no horneada**

Ingrediente	Cantidad (g)
3- <i>n</i> -butilftalida	0.95
Azúcar	114.55
Agua	54.0
Sal	1.5
Jarabe de glucosa	130.0
Jarabe de azúcar invertido	95.0
Jarabe de sorbitol	35.0
Aceite de palmiste	60.0
Grasa para hornear	40.0
Lecitina	1.5
Aceite de palma endurecido	2.5
Manzana cortada y seca	63.0
Copos de maíz	100.0
Arroz crocante	120.0
Trigo crocante	90.0
Avellanas tostadas	40.0
Leche desnatada en polvo	45.0
Sabor de manzana 74863-33	2.0
Ácido cítrico	5.0
Cantidad total	1000

La 3-*n*-butilftalida se premezcla con leche desnatada en polvo y se coloca en una mezcladora de tazón planetario. Se añaden los copos de maíz y el arroz crocante y se mezcla todo cuidadosamente. A continuación se añaden las manzanas cortadas y secas. En una primera olla, se mezcla el azúcar, el agua y la sal en las cantidades indicadas anteriormente (solución 1). En una segunda olla, se mezcla la glucosa, el invertido y el jarabe de sorbitol en las

15

cantidades indicadas anteriormente (solución 2). Una mezcla de grasa para hornear, aceite de palmiste, lecitina y emulsificante constituye la fase grasa. La solución 1 se calienta hasta 110 °C. La solución 2 se calienta hasta 113 °C y a continuación se enfría en un baño de agua fría. Después la solución 1 y la 2 se combinan. La fase grasa se funde a 75 °C en un baño de agua. La fase grasa se añade a la mezcla combinada de la solución 1 y la 2. Se añade el sabor de manzana y el ácido cítrico a la mezcla líquida de azúcar-grasa. Se añade la masa líquida a los ingredientes secos y se mezclan bien en la mezcladora de tazón planetario. Se coloca la masa en una placa de mármol y se extiende hasta obtener el grosor deseado. La masa se enfría hasta temperatura ambiente y se corta en trozos. La barra de cereales no horneada contiene aproximadamente 25 mg de extracto de orégano por unidad (30 g). Se pueden comer 1-2 barras de cereales por día para el bienestar general y para energizarse.

Ejemplo 14: Alimento seco para perros que comprende 3-*n*-butilftalida o ligustilide para aliviar el estrés y revitalizar al perro

Se pulveriza una dieta basal comercial para perros (por ejemplo, Mera Dog "Brocken", MERA-Tiernahrung GmbH, Marienstraße 80-84, D-47625 Kevelaer-Wetten, Alemania) con una solución de 3-*n*-butilftalida o ligustilide en una cantidad suficiente para administrar a un sujeto una dosis diaria de 50 mg de 3-*n*-butilftalida o ligustilide por kg de peso corporal. La composición de comida se seca para contener materia seca de aproximadamente el 90% en peso. Para un perro corriente de 10 kg de peso corporal que consuma aproximadamente 200 g de alimento seco por día, la comida del perro contendrá aproximadamente 2500 mg de 3-*n*-butilftalida o ligustilide por kg de comida. Para perros más pesados, la mezcla de alimento se prepara de manera acorde.

Ejemplo 15: Comida húmeda para gatos que comprende 3-*n*-butilftalida o ligustilide

Se mezcla la dieta basal comercial para gatos (por ejemplo, Happy Cat "Adult", Tierfeinnahrung, Südliche Hauptstraße 38, D-86517 Wehringen, Alemania) con una solución de 3-*n*-butilftalida o ligustilide en una cantidad suficiente para administrar a un sujeto una dosis diaria de 100 mg de 3-*n*-butilftalida o ligustilide por kg de peso corporal. Para un gato corriente de 5 kg de peso corporal que consuma aproximadamente 400 g de comida húmeda por día, la comida del gato contendrá 1250 mg/kg.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica o dietética que comprende ligustilide para su uso en un método de tratamiento o profilaxis para la depresión, trastornos de ansiedad generalizada, disforia, comportamiento obsesivo-compulsivo y trastornos del estado de ánimo.
- 5 2. Una composición para su uso según la Reivindicación 1, donde la composición se presenta en forma de comida en forma sólida o líquida tal como sopas o productos lácteos, en forma de comida reforzante tal como barras de cereales y productos de pastelería tales como pasteles y galletas, en forma de suplementos dietéticos tales como comprimidos, pastillas, gránulos, grageas, cápsulas y formulaciones efervescentes, o en forma de bebidas no alcohólicas tales como refrescos, bebidas deportivas, zumos de frutas, limonadas, té y bebidas lácteas.
3. Una composición para su uso según la Reivindicación 1 ó 2, la cual se utiliza en animales.
- 10 4. El uso no terapéutico de una composición dietética que comprende ligustilide como un potenciador del estado de ánimo/vitalidad, mitigante del estrés, reductor de la ansiedad, reductor de la tensión, la tristeza, la infelicidad, el descontento o la irritabilidad; o para normalizar y mantener los ritmos circadianos, o aliviar o prevenir los síntomas asociados con un desequilibrio en los ritmos circadianos, donde los ritmos circadianos se han desequilibrado debido al defase horario o al trabajo por turnos.
- 15 5. El uso de acuerdo con la Reivindicación 4, donde la composición se presenta en forma de comida en forma sólida o líquida tal como sopas o productos lácteos, en forma de comida enriquecida tal como barras de cereales y productos de pastelería tales como pasteles y galletas, en forma de suplementos dietéticos tales como comprimidos, pastillas, gránulos, grageas, cápsulas y formulaciones efervescentes, o en forma de bebidas no alcohólicas tales como refrescos, bebidas deportivas, zumos de frutas, limonadas, té y bebidas lácteas.
- 20 6. El uso de acuerdo con la Reivindicación 4 ó 5, el cual se utiliza en animales.