

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 302**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/343** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)  
**A61P 19/06** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06753874 .4**  
96 Fecha de presentación: **24.05.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1937250**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2008**

54 Título: **DERIVADOS DE LIGUSTILIDA PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS INFLAMATORIOS.**

30 Prioridad:  
**24.05.2005 EP 05011203**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.02.2012**

73 Titular/es:  
**DSM IP ASSETS B.V.  
HET OVERLOON 1  
6411 TE HEERLEN, NL**

72 Inventor/es:  
**FOWLER, Ann;  
RAEDERSTORFF, Daniel;  
SCHÜLER, Goede y  
SCHWAGER, Joseph**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 375 302 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 ligustilida para el tratamiento de trastornos inflamatorios

La presente invención se refiere al uso de compuestos de la fórmula (I) como agentes para la prevención, control y tratamiento de afecciones que requieren la modulación de la inflamación en mamíferos. En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de compuestos de la fórmula (I) como ingredientes activos en la fabricación de medicamentos para la prevención, control y tratamiento de afecciones que requieren la modulación de la inflamación.

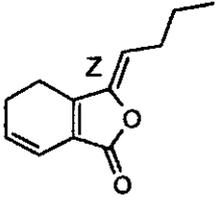
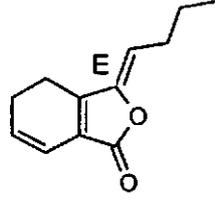
El documento WO 95/00157 describe el uso de sedanolida para el tratamiento de afecciones inflamatorias, mientras que el documento WO 04/100945 describe composiciones farmacéuticas y dietéticas que comprenden ftalidas. Sin embargo, estos documentos no dicen nada con respecto a ligustilida para la prevención y/o tratamiento de enfermedades degenerativas de las articulaciones.

Según la presente invención, se ha encontrado que ciertos compuestos modulan la biosíntesis de mediadores inflamatorios tales como eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos), citocinas, quimiocinas y óxido nítrico. Por lo tanto, tales compuestos son útiles para la prevención, control y tratamiento de afecciones que requieren la modulación de la inflamación. La capacidad para controlar la inflamación es esencial para la salud. La ausencia de control de la inflamación, o la inflamación excesiva y descontrolada dan como resultado numerosas enfermedades, de las cuales muchas son enfermedades y afecciones comunes.

De este modo, en un aspecto, la presente invención se refiere al uso de ligustilida para el tratamiento y prevención de enfermedades inflamatorias.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de ligustilida como se refiere anteriormente en la fabricación de medicamentos para la prevención, control y tratamiento de afecciones que requieren la modulación de la inflamación, particularmente en el tratamiento y prevención de trastornos inflamatorios.

Tabla 0: Lista de compuestos preferidos usados según la presente invención

	Ligustilida
	E-Ligustilida

El término "ligustilida", en el contexto de la presente invención, engloba Z-ligustilida y E-ligustilida, así como cualquier mezcla de ellas, especialmente mezclas de  $\geq 90\%$  en peso de Z-ligustilida y  $\leq 10\%$  en peso de E-ligustilida, basado en el peso total de la mezcla. Se prefiere especialmente Z-ligustilida.

Para uso en la presente invención, la ligustilida se puede aislar por métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Beck J.J. y Stermitz F.R., J. Natural Products, Vol. 58, nº 7, p. 1047-1055, 1995] a partir de diversas plantas tales como *Angelica glauca*, *Angelica acutiloba*, *Angelica sinensis*, *Angelicae dahuricae*, *Ligusticum acutilobum*, *Ligusticum officinale*, *Ligusticum sinense*, *Ligusticum wallichii*, *Cnidium officinale*, *Rhizoma Chuanxiong*, *Pleurospermum hookeri*, *Trachyspermum roxburghianum*, *Meum athamanticum*, *Lomatium torreyi*, *Scutellaria baicalensis*, *Opopanax chironium*, *Cenolophium denudatum*, *Coriandrum sativum*, *Silaum silaus*. Los compuestos usados aquí también pueden ser de origen sintético.

En una realización adicional particularmente preferida de la presente invención, la ligustilida se usa en forma de un extracto de planta purificado, por ejemplo a partir de una especie de *Ligusticum*, especialmente *L. wallichii*, que comprende al menos alrededor de 50% en peso de ligustilida, y no más de 10% en peso de ácidos grasos y

triglicéridos como se obtiene mediante el procedimiento descrito en la solicitud de patente europea nº 05 002333.2 y la solicitud PCT PCT/EP2006/000648, basándose en las cuales sus contenidos se incorporan aquí como referencia.

5 Según un aspecto de la invención descrito en la solicitud de patente PCT PCT/EP2006/000648, un extracto de especie de *Ligusticum* que contiene menos de 50% en peso de ligustilida y más de 5% en peso de ácidos grasos y glicéridos, se somete a una rectificación. La rectificación se lleva a cabo de forma adecuada a una temperatura en el intervalo de 130°C a 400°C, y a una presión en el intervalo de 0,1 mbares a 25 mbares. En una realización preferida, la rectificación se lleva a cabo a una temperatura de calentamiento en el intervalo de 200°C a 230°C, y a una presión en la parte superior de la columna de rectificación en el intervalo de 0,1 mbares a 3 mbares. De forma adecuada, el extracto usado como el material de partida en este procedimiento es un extracto de raíces de una especie de *Ligusticum*, especialmente raíces secas de *L. wallichii*, y se obtiene mediante extracción mediante fluido supercrítico usando, por ejemplo, dióxido de carbono. En una realización preferida, el extracto se somete, antes de la rectificación, a una desgasificación en una unidad desgasificadora. La unidad desgasificadora puede ser cualquier sistema evaporador que permita eliminar agua del extracto aplicando calor y presión reducida. De forma conveniente, la desgasificación se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 120 a 180°C a 10-50 mbares.

15 Mediante ese procedimiento, la ligustilida y otros compuestos de fórmula (I), como senkyunolida, 3-n-butilftalida, sedanolida, 3-butilidenftalida, se pueden enriquecer en el destilado resultante hasta alrededor de 90% basado en el peso del destilado. En contraste con el material de partida, el destilado obtenido en ese procedimiento huele agradablemente, y muestra un color amarillo claro. Los glicéridos y ácidos grasos libres están enriquecidos en el residuo de destilación.

20 La rectificación se puede llevar a cabo con todo tipo de evaporadores; sin embargo, un equipo preferido es un evaporador de película delgada frotada con un tiempo de residencia corto, preferiblemente que no excede 3 minutos, y caída de presión baja.

25 La columna de rectificación puede estar equipada con todo tipo de elementos internos diferentes de la columna, como bandejas, empaquetamientos aleatorios o estructurados; sin embargo, un elemento interno preferido es un empaquetamiento estructurado con una caída de presión baja y una pequeña retención de líquido. Esto evita la degradación de los compuestos de la fórmula (I) a mayores temperaturas y tiempos de residencia más prolongados.

30 Un montaje de columna de rectificación preferido según el procedimiento descrito anteriormente está equipado con una extracción lateral de líquido en la sección rectificadora de la columna. Si el extracto de *ligusticum* purificado resultante se extrae de la columna de rectificación como una extracción lateral de líquido, conduce a una mayor concentración de ftalida, debido a que otros componentes de bajo punto de ebullición, en comparación con las ftalidas, se pueden separar con la corriente del destilado. Se puede lograr el mismo efecto si la rectificación está equipada con una columna de pared dividida. En este caso, el extracto de *ligusticum* purificado resultante también se extrae de la columna como una extracción lateral.

35 El procedimiento se puede llevar a cabo de forma discontinua y preferiblemente en modo continuo debido a la inestabilidad térmica de las ftalidas. El extracto purificado, según se obtiene mediante el procedimiento, se puede convertir en formulaciones sólidas mediante técnicas convencionales.

En los ejemplos 11 y 12 se describen ejemplos preferidos del procedimiento descrito en la solicitud PCT PCT/EP2006/000648.

40 La ligustilida o los extractos vegetales que contienen ligustilida se pueden usar como composiciones nutracéuticas, es decir, como suplemento a composiciones dietéticas, es decir, alimento o bebidas, o como composiciones en forma de dosis unitaria, tales como composiciones farmacéuticas, por ejemplo comprimidos o cápsulas que pueden comprender además vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables, incluyendo, pero sin limitarse a, lubricantes, colorantes, agentes humectantes, cargas, agentes disgregantes y saborizantes.

45 La composición farmacéutica o dietética puede estar en forma que se selecciona del grupo que consiste en alimento o pienso fortificado, bebidas, comprimidos, gránulos, cápsulas, pastas, y formulaciones efervescentes. Las pastas se pueden introducir en cápsulas de gelatina duras o blandas.

La ligustilida se usa preferiblemente en una concentración de manera que se administren al menos 0,005 mg/kg de peso corporal/día a un animal, incluyendo seres humanos.

50 Preferiblemente, para uso según la presente invención, una dosis efectiva de ligustilida para un animal, incluyendo un ser humano, está en el intervalo de 0,01 a 50 mg/kg de peso corporal/día, más preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 25 mg/kg de peso corporal/día, incluso más preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal/día, lo más preferible en el intervalo de 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal/día, basado en el peso de los compuestos puros de fórmula (I).

Como se señala anteriormente, la ligustilida es útil para la prevención, el control y el tratamiento de afecciones que

requieran la modulación de la inflamación. También se puede usar como un auxiliar en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos en los que está implicada la inflamación.

5 Las afecciones que requieren modulación de la inflamación significan incluir enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, tales como enfermedades degenerativas de las articulaciones, incluyendo osteoartritis, gota y espondilitis anquilosante, tendinitis, bursitis.

Así, la presente invención está dirigida especialmente al uso de ligustilida como se define anteriormente (en la fabricación de un medicamento/composición) para la prevención, control y tratamiento de afecciones que requieran la modulación de la inflamación, especialmente aquellas afecciones como se mencionan anteriormente.

10 Finalmente, la ligustilida se puede usar en combinación con otras composiciones nutraceuticas o agentes terapéuticos conocidos por los expertos en la técnica, para el tratamiento o prevención de enfermedades inflamatorias mediante la administración antes, simultáneamente con o tras la administración de ligustilida.

Los siguientes Ejemplos son ilustrativos pero no limitativos de la invención.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Cápsula de gelatina blanda

15 Se preparan cápsulas de gelatina blandas mediante procedimientos convencionales que proporcionan una dosis de ligustilida/extractos de ligustilida de 100 mg.

Otros ingredientes: glicerol, agua, gelatina, aceite vegetal.

#### Ejemplo 2: Cápsula de gelatina dura

20 Se preparan cápsulas de gelatina duras mediante procedimientos convencionales que proporcionan una dosis de ligustilida/extractos de ligustilida de 200 mg.

Otros ingredientes:

Cargas: lactosa o celulosa o derivados de celulosa c.s.

Lubricante: estearato de magnesio si es necesario (0,5%)

#### Ejemplo 3: Comprimido

25 Los comprimidos se preparan mediante procedimientos convencionales que proporcionan, como ingrediente activo, 50 mg de ligustilida por comprimido, y, como excipientes, celulosa microcristalina, dióxido de silicio (SiO<sub>2</sub>), estearato de magnesio, croscarmelosa sódica hasta 200 mg.

#### Ejemplo 4: Bebida no alcohólica

Una bebida no alcohólica que contiene ligustilida o un extracto de ligustilida se puede preparar según lo siguiente:

30 I. Se prepara un compuesto de bebida no alcohólica a partir de los siguientes ingredientes:

<b>1.1 Concentrados de zumo y sabores solubles en agua</b>	<b>[g]</b>
Concentrado de naranja 60,3° Brix, 5,15% de acidez	657,99
Concentrado de limón 43,5° Brix, 32,7% de acidez	95,96
Sabor a naranja, soluble en agua	3,43
Sabor a albaricoque, soluble en agua	6,71
Agua	26,46
<b>1.2 Color</b>	
β-Caroteno 10% CWS (CWS = soluble en agua fría)	0,89
Agua	67,65
<b>1.3 Ácido y antioxidante</b>	

Ácido ascórbico	4,11
Ácido cítrico anhidro	0,69
Agua	43,18
<b>1.4 Estabilizantes</b>	
Pectina	0,20
Benzoato de sodio	2,74
Agua	65,60
<b>1.5 Sabores solubles en aceite</b>	
Sabor a naranja, soluble en aceite	0,34
Destilado de aceite de naranja	0,34
<b>1.6 Ingrediente activo</b>	
Ligustilida o extracto de ligustilida en una cantidad que proporciona 500 mg de ligustilida	

Los concentrados de zumo de frutas y los sabores solubles en agua se mezclan sin incorporación de aire. El color se disuelve en agua desionizada. El ácido ascórbico y el ácido cítrico se disuelven en agua. El benzoato de sodio se disuelve en agua. La pectina se añade bajo agitación, y se disuelve mientras hierve. La disolución se enfría. El aceite de naranja y los sabores solubles en aceite se premezclan. El ingrediente activo, como se menciona en 1.6, se agita en la mezcla de concentrado de zumo de frutas (1.1).

A fin de preparar el compuesto de bebida no alcohólica, todas las partes 3.1.1 a 3.1.6 se mezclan juntas antes de homogeneizar usando un Turrax y después un homogeneizador de alta presión ( $p_1 = 200$  bares,  $p_2 = 50$  bares).

#### Ejemplo 5: Inhibición de los mediadores inflamatorios

Los efectos antiinflamatorios de los compuestos se evaluaron en macrófagos activados determinando la inhibición de la síntesis de óxido nítrico y/o  $PGE_2$ . A fin de inducir una "respuesta inflamatoria" in vitro, se estimularon macrófagos murinos RAW264.7 con lipopolisacárido (LPS), sin o con cantidades escalonadas de sustancias de ensayo. Las células de macrófagos murinos RAW264.7 respondieron a la estimulación con LPS mediante la liberación de cantidades sustanciales de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), y óxido nítrico (NO), que está alterada por los compuestos antiinflamatorios. Las prostaglandinas  $PGE_2$  desempeñan un papel crítico en el proceso inflamatorio, mientras que el óxido nítrico es un sello distintivo de la inflamación en afecciones como artritis. Por lo tanto, se evaluó el efecto de los compuestos sobre la producción de  $PGE_2$  y NO.

Las células RAW264.7 se cultivaron en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal de ternera (FCS), 50 unidades/ml de penicilina, 50  $\mu$ g/ml de estreptomina, L-glutamina y aminoácidos no esenciales (NEAA, Life Technologies, n° 11140). Las células RAW se usaron entre la pasada 10 y 50. Para los experimentos, las células se sembraron en placas de 6 pocillos, 12 pocillos o 96 pocillos a 2, 1 y 0,05 células mio por pocillo, respectivamente, y se usaron después de 1 ó 2 días de precultivo. A las células se les privó de alimento en medio DMEM completo que contiene 0,25% de FCS, 18 horas antes del tratamiento. Las células se estimularon con LPS (1  $\mu$ g/ml) durante 24 horas en DMEM libre de fenol que contiene 0,25% de FCS. Las sustancias a ensayar se disolvieron en DMSO (habitualmente a 10 mM), y se añadieron al medio de cultivo concomitantemente con el estímulo. Cuando fue apropiado, se añadió DMSO a los cultivos celulares para ajustar la concentración del vehículo, que no superó 0,5%. Después de 24 horas, se midieron las concentraciones de nitrito en los sobrenadantes de cultivo mediante la reacción de Griess, y se determinó la  $PGE_2$  segregada mediante inmunoensayo enzimático (EIA) en células RAW264.7 sin estimular y estimuladas con LPS. Los compuestos se ensayaron simultáneamente a diferentes concentraciones para obtener una curva de respuesta frente a la dosis. La potencia se evaluó determinando la concentración que provoca una inhibición del 50% de la producción de  $PGE_2$  o de NO, y se da como la  $IC_{50}$ . La ligustilida produjo potentemente la producción de óxido nítrico (NO) con una  $IC_{50}$  de  $12,2 \pm 3,1 \mu$ M. Los efectos de los compuestos de la fórmula (I) sobre la producción de  $PGE_2$  también se midieron en la estirpe celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (Tabla 1).

Tabla 1: Inhibición de la formación de PGE<sub>2</sub> en macrófagos estimulados

	Producción de PGE <sub>2</sub> por las células RAW, IC <sub>50</sub> (μM)
Ligustilida	3,2
N-Butilidenftalida	3,0
3-Butilftalida	3,0

Ejemplo 6: Modulación de los niveles de expresión de genes inflamatorios:

5 Se cultivaron células THP-1, una estirpe celular monocítica/histiocítica humana, en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FCS, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, NEAA y  $2 \times 10^{-5}$  M de β-mercaptoetanol. Las células se trataron con miristato-acetato de forbol 50 nM, durante 3 días. A las células se les privó de alimento toda la noche en medio que contiene 0,25% de FCS antes de tratarlas. Las células se estimularon con LPS (1 μg/ml) durante 4 horas en RPMI libre de fenol que contiene 0,25% de FCS. Se añadió ligustilida (25 μM) al medio de cultivo concomitantemente con el estímulo. Se añadió DMSO a los cultivos de células de control para  
10 ajustar la concentración de vehículo, que no superó 0,5%. La estimulación con LPS induce la expresión de una gran variedad de genes, incluyendo aquellos de las rutas inflamatorias. Después de 4 horas de estimulación, se evaluó el impacto de ligustilida sobre la expresión de genes inflamatorios usando tecnología de RT-PCR en tiempo real cuantitativa (reacción en cadena de polimerasa mediante transcriptasa inversa) (Tabla 2).

Tabla 2: Efectos de ligustilida sobre la expresión génica en células THP-1

Gen	Expresión génica (en %) con relación al control de LPS
COX-2	24,1
TNF-α	50,6
IL-8	72,4
MIP-2	52,0
MIP-3α	67,2
IL-1α	15,2
IL-6	52,3

15 Los datos de la Tabla 2 muestran que la ligustilida reduce un número de genes implicados en la modulación de la respuesta inflamatoria. Las citocinas TNF-α, IL-1α, IL-6, IL-8 han estado implicadas en enfermedades inflamatorias agudas y crónicas y en osteoporosis.

Ejemplo 7: Efectos de ligustilida sobre el edema de la pata inducido por carrageenano en ratas

20 La actividad antiinflamatoria de los compuestos se evaluó in vivo en el modelo de rata de edema de pata inducido por carrageenano. Este modelo se ha usado desde hace mucho tiempo para evaluar las propiedades antiinflamatorias de agentes que inhiben prostaglandinas, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs). El modelo provoca la formación de edema dependiente del tiempo tras la administración de carrageenano en la superficie subplantar de una pata de rata.

25 Se distribuyeron al azar en dos grupos veinte ratas macho Sprague-Dawley, que pesan 130 a 146 g. Se enjaularon en una habitación de temperatura (19,5-24,5°C) y humedad relativa (45-65%) controlada, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, y con acceso a voluntad a agua corriente filtrada y a pienso de laboratorio en peletes estándar durante el estudio. Se enjaularon 5 por jaula, y se observó un período de aclimatación de 5-6 días antes de cualquier ensayo. Los animales se identificaron individualmente en la cola. Se administró ligustilida (100 mg/kg), suspendida en 1% de metilcelulosa (en un volumen de 10 ml/kg), o vehículo solo mediante la ruta oral en un orden  
30 codificado y al azar después de un ayuno nocturno. Una hora después, se indujo inflamación mediante inyección subplantar de una suspensión al 2% de carrageenano en la pata derecha. El volumen de la pata de cada rata se

5 midió en ml en los siguientes puntos de tiempo: 0 h, 1,5 h, 3 h, y 4,5 h después de la inyección de carrageenano. El volumen del edema de la pata de cada rata en cada punto de tiempo se expresó como el cambio desde el valor inicial. El efecto antiinflamatorio sobre el volumen del edema en los grupos tratados se expresó como % de inhibición [(media de volumen de edema de la pata del grupo tratado con el vehículo – media del volumen del edema de la pata del grupo tratado)/media del volumen del edema de la pata del grupo tratado con el vehículo) x 100].

Tabla 3: Efectos farmacológicos de ligustilida tras la administración oral sobre el edema de la pata inducido por carrageenano en ratas

Tiempo (horas)	Volumen del edema de la pata (ml)		% de Inhibición de ligustilida
	Animales tratados con el vehículo	Animales tratados con Ligustilida	
1,5	0,24	0,17	29
3	0,40	0,32	27
4,5	0,45	0,40	11

Todos los datos del volumen del edema de la pata se expresan en ml como media de 10 ratas en cada grupo.

10 % de Inhibición frente al grupo tratado con vehículo

La ligustilida (100 mg/kg) inhibió el volumen medio del edema de la pata 1,5 h, 3 h y 4,5 h después de la inyección de carrageenano en comparación con el grupo de control tratado con el vehículo.

#### Ejemplo 8: Efectos de ligustilida en artritis inducida por caolín en ratas

15 En este estudio se incluyeron veinte ratas macho Sprague-Dawley, que pesan 103 g a 132 g. Se enjaularon en una habitación de temperatura (19,5-24,5°C) y humedad relativa (45-65%) controlada, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, con acceso a voluntad a agua corriente filtrada y comida de laboratorio en peletes estándar, durante el estudio. En la recepción en las instalaciones para animales, se enjaularon 5 por jaula, y se observó un periodo de aclimatación de al menos 5 días antes de cualquier ensayo. Los animales se identificaron individualmente en la cola.

20 La artritis se indujo mediante inyección de una suspensión al 10% de caolín en la articulación de la rodilla de la pata posterior derecha de las ratas. En el grupo tratado con vehículo, la inyección de la suspensión de caolín en la articulación de la rodilla de la pata trasera derecha de las ratas indujo una alteración del modo de andar, evaluada mediante un incremento de la puntuación del andar (puntuación de 0 a 3). El modo de andar de los animales se usa para medir el comportamiento doloroso espontáneo. Se administró ligustilida (100 mg/kg), suspendida en 1% de metilcelulosa (en un volumen de 10 ml/kg), o vehículo solo mediante la ruta oral en un orden codificado y aleatorio,

25 30 minutos después de la inyección de caolín. La evaluación del comportamiento de puntuación se monitorizó cada hora desde 1,5 horas hasta 5,5 horas tras la dosificación del fármaco. La puntuación media del andar se calculó a partir de valores individuales en cada momento. El porcentaje de inhibición de la puntuación media de andar, en comparación con el valor medio del grupo de control, se calculó 1,5, 2,5, 3,5, 4,5 horas y 5,5 horas después de la dosificación.

30 Tabla 4: Efecto de ligustilida administrada oralmente sobre la evolución de la puntuación del modo de andar tras la artritis inducida por caolín en ratas

Tiempo (horas)	Puntuación del modo de andar		% de mejora por ligustilida
	Control	Ligustilida	
1,5	0,4	0,3	25
2,5	0,7	0,4	43
3,5	1,2	0,6	50
4,5	1,9	0,9	53
5,5	2,1	1,3	38

Los resultados se expresan para cada grupo como la media de las puntuaciones del modo de andar de 10 animales por grupo.

La ligustilida indujo una mejora de la puntuación del modo de andar después de la inducción de la artritis en comparación con el grupo de control. Se observó un efecto analgésico significativo a las 3,5, 4,5 y 5,5 horas tras la dosificación, en comparación con el grupo de control.

#### Ejemplo 9: Efecto de ligustilida sobre condrocitos

Los tejidos articulados, es decir, las articulaciones, contienen condrocitos. Su deterioro fisiológico conduce a la erosión de los componentes del tejido de la articulación, y de este modo, por ejemplo, a la osteoartritis. Se ha evaluado el efecto de ligustilida sobre sucesos catabólicos en condrocitos. Se activaron células de condrosarcoma SW1353 o condrocitos humanos normales (derivados de la rodilla) con interleucina-1 $\beta$  en presencia de una cantidad escalonada de compuestos de ensayo durante 4 horas. Después se extrajo el ARN de estas células, y se transcribió de forma inversa. La expresión de genes marcadores para sucesos catabólicos, como metaloproteinasas de la matriz (MMPs), se determinó mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (RT-PCR). Como se muestra en la Tabla 5, la ligustilida influyó sobre el nivel de expresión de varias MMPs, que están implicadas críticamente en la destrucción de la matriz extracelular. La ligustilida redujo su expresión y de este modo se supone que evita la erosión tisular en enfermedades osteoartríticas. Por el contrario, incrementó los niveles de ARNm de colágeno; esto sugiere que favorece sucesos que contribuyen a la reconstitución de la matriz extracelular.

Tabla 5

Gen	Expresión génica (en %) con relación a condrocitos activados con IL-1 $\beta$
MMP-1	17
MMP-3	2
MMP-9	33
MMP-13	50
Colágeno 1	115
Colágeno 2	184

#### Ejemplo 10: Efectos de ligustilida sobre la adhesión celular a células endoteliales

Las lesiones arteroscleróticas se pueden desarrollar como consecuencia de disfunción endotelial. Esto se refleja por la adhesión alterada, es decir, incrementada, de monocitos a las capas endoteliales. Se evaluó el efecto de ligustilida sobre la adhesión de U937, una estirpe celular monocítica, a células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC). Las HUVEC se estimularon con TNF- $\alpha$  en ausencia o presencia de ligustilida (25 ó 50  $\mu$ mol/l) durante 20 horas, y la adhesión de U937 se determinó según Carluccio et al. (Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23, 622-629). Como se muestra en la Tabla 6, la adhesión se vio impedida significativamente por la ligustilida de una manera dependiente de la concentración. La adhesión de monocitos a capas endoteliales está mediada por la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1). Por lo tanto, se analizaron adicionalmente los efectos de ligustilida sobre el nivel de ARNm de ICAM-1 en HUVEC mediante RT-PCR cuantitativa. Se observó una reducción, dependiente de la dosis, de la expresión del gen de ICAM-1 en estas células (Tabla 7). Esto revela un efecto molecular de ligustilida sobre sucesos de adhesión celular. La adhesión reducida de monocitos, vía la expresión reducida de ICAM, reestablece la homeostasis del endotelio, y por lo tanto contribuye a la prevención de la formación de ateroma.

Tabla 6: Efecto de ligustilida sobre la adhesión monocítica (estimulación durante 20 horas)

Tratamiento de HUVEC	Número de células adherentes	% de reducción de la adherencia
TNF- $\alpha$	99 $\pm$ 30	-
TNF- $\alpha$ + 25 $\mu$ M de ligustilida	61 $\pm$ 25	39
TNF- $\alpha$ +50 $\mu$ M de ligustilida	27 $\pm$ 21	73

Tabla 7: Efecto de ligustilida sobre la expresión de ARNm de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (2 horas de estimulación)

Tratamiento de HUVEC	Nivel relativo de ICAM-1 (unidades arbitrarias)	% de reducción de la expresión de ARNm
TNF- $\alpha$	59 $\pm$ 18	-
TNF- $\alpha$ + 25 $\mu$ M de ligustilida	25 $\pm$ 6	58
TNF- $\alpha$ +50 $\mu$ M de ligustilida	16 $\pm$ 1	73

5 Ejemplo 11

El extracto de ligusticum bruto, por ejemplo según se obtiene mediante extracción supercrítica con dióxido de carbono a partir de raíces de Ligusticum con una concentración total de ftalida de 29% en peso (8,2% en peso de senkyunolida, 0,5% en peso de 3-n-butilftalida, 1,2% en peso de sedanolida, 18,3% en peso de ligustilida, 0,6% en peso de 3-butilidenftalida), se purificó mediante una rectificación de vacío continua hasta una concentración total de ftalida de 90% en peso (26,4% en peso de senkyunolida, 1,6% en peso de 3-n-butilftalida, 3,7% en peso de sedanolida, 56,3% en peso de ligustilida, 2,0% en peso de 3-butilidenftalida).

Primero, el ligusticum bruto se desgasificó a fin de separar el agua del extracto bruto. A una presión reducida de 25 mbares y una temperatura de calentamiento de 160°C, se evaporó aprox. 1,0% de la cantidad de alimentación. El residuo comprende el extracto de ligusticum bruto casi libre de agua. Este material se alimentó de forma continua en el montaje de rectificación (evaporador de película delgada frotada con un área de calentamiento de 0,05 m<sup>2</sup>, y una columna de destilación con empaquetamientos estructurados de 1 m de altura) a fin de concentrar las ftalidas en la corriente de destilado resultante de la columna (véase la Figura 1, sin que funcione la extracción lateral de líquido). En condiciones con una presión de columna en la parte superior reducida de 0,5 mbares y a una temperatura de calentamiento de 230°C, la relación de destilado/alimentación fue 0,33:1. La relación de reflujo de la corriente de destilado fue alrededor de 1. Los glicéridos y los ácidos grasos libres están enriquecidos en el residuo de destilación. La corriente de destilado contiene todas las ftalidas mencionadas anteriormente en una concentración total de ftalida de 90% en peso. El color del extracto de ligusticum purificado final fue 4,7 en la escala de Gardner.

Ejemplo 12

El extracto de ligusticum bruto, por ejemplo como se obtiene mediante extracción supercrítica con dióxido de carbono a partir de raíces de Ligusticum con una concentración total de ftalida de 36% en peso (11,4% en peso de senkyunolida, 1,1% en peso de 3-n-butilftalida, 1,6% en peso de sedanolida, 20,4 en peso de ligustilida, 1,3% en peso de 3-butilidenftalida), se purificó mediante una rectificación de vacío continua con una extracción lateral de líquido hasta una concentración total de ftalida de 94% en peso (29,3% en peso de senkyunolida, 3,3% en peso de 3-n-butilftalida, 3,9% en peso de sedanolida, 53,5% en peso de ligustilida, 3,9% en peso de 3-butilidenftalida), de la siguiente manera.

En primer lugar, el ligusticum bruto se desgasificó a fin de separar el agua del extracto bruto. A una presión reducida de 25 mbares y una temperatura de calentamiento de 160°C, se evaporó aprox. 1,0% de la cantidad de alimentación. El residuo comprende el extracto de ligusticum bruto casi libre de agua. Este material se alimentó de forma continua en el montaje de rectificación (evaporador de película delgada frotada con un área de calentamiento de 0,05 m<sup>2</sup>, una columna de destilación con empaquetamientos estructurados de 1,5 m de altura, y una extracción lateral de líquido a una altura de columna de 1 m desde abajo) a fin de concentrar las ftalidas en la corriente lateral de líquido resultante (véase la Figura 1, con funcionamiento de extracción lateral de líquido).

A una presión reducida de 1 mbar y una temperatura de calentamiento de 230°, la corriente de alimentación se separó como sigue en 36% de corriente lateral de líquido, 62% de residuo y 2% de destilado. La relación de reflujo del destilado fue alrededor de 10, y la relación de reflujo de la corriente lateral fue alrededor de 1. Los glicéridos y los ácidos grasos libres están enriquecidos en el residuo de destilación, y los componentes de bajo punto de ebullición están enriquecidos en el destilado. Las ftalidas deseadas están enriquecidas en la corriente lateral de líquido, con una concentración de 94%. El color del extracto de ligusticum purificado final fue 4,6 en la escala de Gardner.

**REIVINDICACIONES**

1. Ligustilida para uso en la prevención, control y tratamiento de enfermedades degenerativas de las articulaciones en un mamífero.
- 5 2. Ligustilida para uso como en la reivindicación 1, en el que la ligustilida está en forma de un extracto de planta purificado.
3. Ligustilida para uso como en la reivindicación 1, en el que el extracto de planta purificado es un extracto de *L. wallichii*.
4. El uso de un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la fabricación de un medicamento para la prevención, control y tratamiento de enfermedades degenerativas de las articulaciones.

Figura 1:

