

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 471 449**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/365</b>	(2006.01) <b>A23K 1/18</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/192</b>	(2006.01) <b>A23K 1/16</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/19</b>	(2006.01) <b>A23L 1/30</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/122</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/085</b>	(2006.01)	
<b>A61K 36/53</b>	(2006.01)	
<b>A61K 36/537</b>	(2006.01)	
<b>A61P 25/22</b>	(2006.01)	
<b>A61P 25/24</b>	(2006.01)	
<b>A61P 25/26</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2007 E 07856229 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2083809**

54 Título: **Composiciones dietéticas o farmacéuticas que contienen diterpenos tricíclicos para el tratamiento de la depresión**

30 Prioridad:

**24.11.2006 EP 06024385**

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

**26.06.2014**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)  
HET OVERLOON 1  
6411 TE HEERLEN, NL**

72 Inventor/es:

**DE SAIZIEU, ANTOINE;  
FOWLER, ANN;  
GORALCZYK, REGINA;  
KILPERT, CLAUS;  
SCHUELER, GOEDE y  
WEHRLI, CHRISTOF**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 471 449 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

Composiciones dietéticas o farmacéuticas que contienen diterpenos tricíclicos para el tratamiento de la depresión

## 5 Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a la utilización de diterpenos tricíclicos según se define en las reivindicaciones.

## 10 Antecedentes de la invención

Es bien conocido que la neurotransmisión alterada, por ejemplo los niveles bajos de neurotransmisor, se relacionan con enfermedades mentales tales como la depresión y los trastornos de ansiedad generalizada (TAG) y la sensibilidad incrementada al estrés.

15 Los compuestos que incrementan los niveles de los neurotransmisores en el cerebro y que, de esta manera, incrementan su transmisión, pueden mostrar propiedades antidepresivas, así como efectos beneficiosos sobre una diversidad de otros trastornos mentales (Neurotransmitters, drugs and brain function, R.A. Webster (ed.), John Wiley & Sons, New York, 2001, páginas 187 a 211, 289-452, 477-498). Los neurotransmisores principales son la serotonina, la dopamina, la noradrenalina (=norepinefrina), la acetilcolina, el glutamato, el ácido gamma-amino-butírico, así como los neuropéptidos. Entre los neurotransmisores de particular relevancia para los trastornos relacionados con el humor se incluyen la serotonina, la noradrenalina y la dopamina. Se consigue una neurotransmisión incrementada o prolongada mediante el incremento de la concentración del neurotransmisor en la hendidura sináptica, mediante la inhibición de la recaptación en la terminación nerviosa presináptica, o mediante la prevención del catabolismo de los neurotransmisores mediante inhibición de los enzimas degradativos, tales como las monoamina-oxidasas (MAO) -A y -B.

Antidepresivos y trastornos relacionados con el humor

30 Los compuestos antidepresivos tricíclicos (CAT), tales como la imipramina, amitriptilina y clomipramina, inhiben la recaptación de la serotonina y la noradrenalina. Se suelen considerar de entre los antidepresivos más eficaces disponibles, aunque presentan varias desventajas porque además interactúan con los receptores muscarínicos de la acetilcolina, de la histamina y de la serotonina. Entre los efectos secundarios que resultan de dichas actividades se incluyen boca seca, visión borrosa, estreñimiento y retención urinaria, además de hipotensión postural. Más importante, los CAT no son seguros cuando se ingieren sobredosis, mostrando con frecuencia cardiotoxicidad aguda.

35 Otra clase de fármacos antidepresivos son los denominados ISRS (inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina), incluyendo la fluoxetina, la paroxetina, la sertralina, el citalopram y la fluvoxamina, los cuales bloquean el transportador de la serotonina (SERT), un transportador de neurotransmisores de alta afinidad dependiente del cloruro sódico que termina la neurotransmisión serotoninérgica mediante la recaptación de la serotonina. Se ha demostrado que resultan tan eficaces en el tratamiento de la depresión y la ansiedad como los CAT, aunque habitualmente resultan mejor tolerados. Estos medicamentos típicamente se inician a dosis bajas y se incrementa hasta que alcanzan un nivel terapéutico. Un efecto secundario habitual es la náusea. Entre otros posibles efectos secundarios se incluyen la reducción del apetito, boca seca, sudoración, infección, estreñimiento, temblores, bostezos, somnolencia y disfunción sexual.

40 Además, los compuestos que evitan el catabolismo de los neurotransmisores más ampliamente mediante la inhibición de las MAO-A y -B muestran efectos antidepresivos. Las MAO catalizan la oxidación de los neurotransmisores que contienen grupos amino, tales como serotonina, noradrenalina y dopamina.

45 Además, los moduladores de la neurotransmisión ejercen efectos pleiotrópicos sobre las funciones mentales y cognitivas.

50 Existe una necesidad de compuestos para el tratamiento o la prevención de enfermedades y/o trastornos mentales que no muestran los efectos secundarios negativos de los antidepresivos conocidos. Muchos pacientes están interesados en terapias alternativas que podrían minimizar los efectos secundarios asociados a dosis altas de fármacos y rinden beneficios clínicos aditivos. La depresión severa es una enfermedad de larga duración y recurrente que habitualmente ha sido mal diagnosticada. Además, muchos pacientes sufren de depresión leve o moderada. De esta manera, existe un creciente interés en el desarrollo de compuestos, así como composiciones farmacéuticas y/o dietéticas que pueden utilizarse para tratar enfermedades/trastornos mentales o para prevenir el desarrollo de enfermedades/trastornos mentales, tales como la depresión y la distimia en personas en situación de riesgo, para estabilizar el humor y conseguir un equilibrio emocional.

Además, los pacientes con frecuencia sufren como comorbilidad a la depresión o por sí misma de síndrome de ansiedad generalizada (SAG). El SAG es una condición de ansiedad y enfermedad crónica altamente prevalente en atención primaria (~10% de pacientes) (Wittchen *et al.*, Eur. Neuropsychopharm. 15:357-376, 2005). Los pacientes se presentan a su médico de atención primaria con múltiples síntomas físicos. El SAG se caracteriza por tensión crónica y preocupación y tensión ansiosas (>6 meses), que son discapacitantes e incontrolables, y que se ven acompañadas por un síndrome característico de hipervigilancia (incluyendo intranquilidad, tensión muscular y problemas de sueño). Si no se trata, el SAG sigue un curso crónico fluctuante y tiende a hacerse más severo con la edad. Los pacientes de SAG sufren de depresión subsindrómica y contribuyen a la carga económica sanitaria directa e indirecta global más alta de entre todos los trastornos de ansiedad y depresivos. A pesar de la elevada incidencia de la SAG, pocos enfermos son diagnosticados, se les prescribe medicación o son remitidos al psiquiatra: se requieren herramientas diagnósticas simples para ayudar a la identificación y seguimiento del paciente. Con independencia del diagnóstico específico, el médico requiere tratamientos eficaces para los síntomas de la SAG. Los SSRI tales como la paroxetina resultan eficaces para el tratamiento de la SAG [Stocchi *et al.*, J. Clin. Psych. 63(3):250-258, 2003]. Además, las revisiones sistemáticas y los ECA (ensayos clínicos aleatorizados) con placebo indican que algunos SSRI (escitalopram, paroxetina y sertralina), el IRNS (inhibidores selectivos de la recaptación de la norepinefrina) venlafaxina, algunas benzodiazepinas (alprazolam y diazepam), el tricíclico imipramina y el agonista parcial de 5-HT<sub>1A</sub> buspirona son todos eficaces en el tratamiento agudo. En general, el efecto del tratamiento con frecuencia es moderado y los síntomas reaparecen al interrumpir el periodo de tratamiento. Por lo tanto, un tratamiento continuo a largo plazo o la prevención con compuestos que presentan menos efectos secundarios que los SSRI y que puedan administrarse durante periodos de tiempo prolongados podrían resultar favorables en comparación con el tratamiento farmacológico.

Los trastornos del humor y el estrés ocupacional también conducen consecutivamente a trastornos del sueño, insomnio, baja calidad del sueño y alteraciones del ritmo circadiano. Estas condiciones con frecuencia son crónicas y pueden persistir un largo tiempo. Además, la desregulación de los ritmos circadianos inducida por los vuelos de larga duración ("jet-lag"), así como el trabajo por turnos, pueden provocar síntomas y angustia similares. Por lo tanto, el tratamiento con un complemento dietético para aliviar y prevenir los síntomas asociados a los trastornos del sueño, tales como las alteraciones de la función cognitiva y la memoria, la fatiga mental y física, y la somnolencia, se justifica para mejorar la calidad global de vida y obtener el beneficio de una mayor energía vital de la persona que lo requiere.

Herrera-Ruiz *et al.*, Journal of Ethnopharmacology, 107:53-58, 2006, y Mora *et al.*, Journal of Ethnopharmacology, 106:76-81, 2006, dan a conocer la utilización de un extracto hidroalcohólico de *Salvia elegans* para el tratamiento de la depresión y la ansiedad.

Frishman *et al.*, Seminars in Integrative Medicine 2(1):23-35, 2004, dan a conocer la utilización de hierbas, tales como *Rosmarinus officinalis*, para elevar el humor e incrementar el nivel de energía.

La patente US nº 6.638.523 B1 da a conocer el tratamiento de úlceras, que comprende administrar una cantidad eficaz de ácido carnósico y/o camosol o un extracto vegetal que contiene ácido carnósico y/o carnosol, tal como extractos de *Rosmarinus officinalis* o *Salvia officinalis*, como ingrediente eficaz en un sujeto con dichas úlceras.

Kennedy *et al.*, Neuropsychopharmacology 31:845-852, 2006, dan a conocer los efectos de la salvia (*Salvia officinalis*) como inhibidor de la colinesterasa sobre el humor, la ansiedad y el rendimiento en una batería de estresores psicológicos.

#### Breve descripción de las figuras

La FIGURA 1 muestra compuestos de fórmulas III a VII y XVI.  
La FIGURA 2 muestra compuestos de fórmulas X a XIII. La FIGURA 3 muestra compuestos de fórmulas XIV y XV.

#### Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a la utilización de un diterpeno tricíclico según se define en las reivindicaciones, en particular para la preparación de una composición para la utilización como antidepresivo, mejorante del humor/vitalidad, mitigante del estrés, mejorante del estado general, reductor de la ansiedad, reductor del comportamiento obsesivo-compulsivo, relajante, mejorante del sueño y/o alivante del insomnio.

La invención da a conocer una composición dietética que contiene por lo menos un diterpeno tricíclico tal como se ha definido anteriormente, así como una composición farmacéutica que contiene por lo menos un diterpeno tricíclico tal como se ha definido anteriormente y un portador farmacéutico convencional. Entre los animales en el contexto de la presente invención se incluyen seres humanos y comprenden mamíferos, peces y aves. Los "animales"

preferentes son los seres humanos, animales domésticos y de compañía, y los animales de granja. Son ejemplos de animales domésticos y de compañía, perros, gatos, pájaros, peces de acuario, cobayas, conejos y jackrabbits, liebres y hurones. Son ejemplos de animales de granja, los peces de acuario, cerdos, caballos, rumiantes (vacas, ovejas y cabras) y las aves de corral.

5 Según la presente invención, el diterpeno tricíclico y su derivado se seleccionan de entre el grupo que consiste de:

- 10 ácido carnósico (compuesto de fórmula III, ver la fig. 1),
- ácido 7-oxocalitrísico (compuesto de fórmula IV, ver la fig. 1),
- totarol (compuesto de fórmula V; ver la fig. 1),
- 16-hidroxitotarol (compuesto de fórmula VI; ver la fig. 1),
- metil-éster de ácido totarol-19-carboxílico (compuesto de fórmula VII; ver la fig. 1),
- 20-deoxo-carnosol (compuesto de fórmula X; ver la fig. 2),
- 7-metilrosmanol (compuesto de fórmula XI; ver la fig. 2),
- 15 sageona (compuesto de fórmula XII; ver la fig. 2),
- 8,11,13-abietatrién-11,12,20-triol (compuesto de fórmula XIII; ver la fig. 2),
- ácido roileanónico (compuesto de fórmula XIV; ver la fig. 3),
- ferruginol (compuesto de fórmula XV; ver la fig. 3) y
- 20 12-metil-éter de ácido carnósico (compuesto de fórmula XVI; ver la fig. 1).

Los diterpenos tricíclicos preferentes son: ácido carnósico, ácido 7-oxocalitrísico y 20-deoxo-carnosol. Resultan todavía más preferentes el ácido carnósico y el ácido 7-oxocalitrísico y resulta más preferente el ácido (4*aR*, 10*aS*)-carnósico.

25 La expresión "diterpeno tricíclico" también comprende cualquier material o extracto vegetal que contiene dicho diterpeno tricíclico en una cantidad de por lo menos 30% en peso (es decir, entre 30% y 100% en peso), preferentemente en una cantidad de por lo menos 50% en peso (es decir, entre 50% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 70% en peso (es decir, entre 70% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 90% en peso (es decir, entre 90% y 100% en peso), basado en el peso total del material o extracto vegetal. Las expresiones "material de una planta" y "material vegetal" utilizadas en el contexto de la presente invención se refieren a cualquier parte de una planta.

35 La expresión "ácido carnósico" se refiere a la mezcla racémica, así como al ácido (4*aR*, 10*aS*)-carnósico puro o al ácido (4*aS*, 10*aR*)-carnósico puro o a cualquier mezcla o diastereoisómero de los mismos. El ácido carnósico puede aislarse de plantas como el romero y la salvia, aunque no se encuentra limitado a ellas. La expresión "ácido carnósico" se refiere a ácido carnósico tanto "natural" (aislado) como "sintético" (artificial). La síntesis de ácido carnósico se describe en Chin. Chem. Lett. 12(3):203-204, 2001 (ISSN: 1001-8417).

40 Por lo tanto, cualquier material o extracto de romero o salvia, o cualquier otro material o extracto vegetal que contenga ácido carnósico en una cantidad de por lo menos 30% en peso (es decir, entre 30% y 100% en peso), preferentemente en una cantidad de por lo menos 50% en peso (es decir, entre 50% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 70% en peso (es decir, entre 70% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 90% en peso (es decir, entre 90% y 100% en peso), basado en el peso total del material o extracto vegetal, también se encuentra comprendida en dicha expresión.

45 La expresión "12-metil-éster de ácido carnósico" se refiere a la mezcla racémica, así como a 12-metil-éter de ácido (4*aR*, 10*aS*)-carnósico puro o a 12-metil-éter de ácido (4*aS*, 10*aR*)-carnósico puro o a cualquier mezcla o diastereoisómero de los mismos. El 12-metil-éter de ácido carnósico puede aislarse de plantas como la salvia, el romero, *Hyptis martiusii*, aunque no se encuentra limitada a ellas. La expresión "12-metil-éter de ácido carnósico" se refiere a 12-metil-éter de ácido carnósico tanto "natural" (aislado) como "sintético" (artificial).

50 Por lo tanto, cualquier material o extracto de estas plantas o de cualquier otro material o extracto vegetal que contenga 12-metil-éter de ácido carnósico en una cantidad de por lo menos 30% en peso (es decir, entre 30% y 100% en peso), preferentemente en una cantidad de por lo menos 50% en peso (es decir, entre 50% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 70% en peso (es decir, entre 70% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 90% en peso (es decir, entre 90% y 100% en peso), basado en el peso total del material o extracto vegetal, también se encuentra comprendida en dicha expresión.

60 La expresión "ácido 7-oxocalitrísico" se refiere a la mezcla racémica, así como al ácido (1*S*, 4*aS*, 10*aR*)-7-oxocalitrísico puro o al ácido (1*R*, 4*aR*, 10*aS*)-7-oxocalitrísico puro o a cualquier mezcla o diastereoisómero de los mismos. El ácido 7-oxocalitrísico puede aislarse a partir de plantas tales como, aunque sin limitarse a ellas: *Cynara cardunculus* ssp. *Cardunculus* y *Juniperus chinensis*. Por lo tanto, cualquier material o extracto de estas plantas o de cualquier otro material o extracto vegetal que contenga ácido 7-oxocalitrísico en una cantidad de por lo menos 30%

en peso (es decir, entre 30% y 100% en peso), preferentemente en una cantidad de por lo menos 50% en peso (es decir, entre 50% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 70% en peso (es decir, entre 70% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 90% en peso (es decir, entre 90% y 100% en peso), basado en el peso total del material o extracto vegetal, también se encuentra comprendida en dicha expresión. La expresión "ácido 7-oxocalitrísico" se refiere a ácido 7-oxocalitrísico tanto "natural" (aislado) como "sintético" (artificial).

El término "totarol" se refiere a la mezcla racémica, así como al ácido (4*b*S, 8*a*S)-totarol ((+)-totarol, trans-totarol) o (4*b*R, 8*a*R)-totarol puro o a cualquier mezcla o diastereoisómero de los mismos. El totarol puede aislarse a partir de plantas tales como, aunque sin limitación, salvia, enebro y *Podocarpus* sp. Por lo tanto, cualquier material o extracto de estas plantas o de cualquier otro material o extracto vegetal que contenga totarol en una cantidad de por lo menos 30% en peso (es decir, entre 30% y 100% en peso), preferentemente en una cantidad de por lo menos 50% en peso (es decir, entre 50% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 70% en peso (es decir, entre 70% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 90% en peso (es decir, entre 90% y 100% en peso), basado en el peso total del material o extracto vegetal, también se encuentra comprendida en dicha expresión. El término "totarol" se refiere a totarol tanto "natural" (aislado) como "sintético" (artificial). La síntesis del totarol se describe en varios artículos, por ejemplo en Tetrah. Lett. 44(49):8831-8835, 2003.

El término "16-hidroxitotarol" se refiere a la mezcla racémica, así como a (1*S*, 4*a*S, 10*a*R)-16-hidroxitotarol o (1*R*, 4*a*R, 10*a*S)-16-hidroxitotarol puro o a cualquier mezcla o diastereoisómero de los mismos. El 16-hidroxitotarol puede aislarse a partir de madera de especies de *Podocarpus* y de otras plantas. Por lo tanto, cualquier material o extracto de estas plantas o de cualquier otro material o extracto vegetal que contenga ácido 16-hidroxitotarol en una cantidad de por lo menos 30% en peso (es decir, entre 30% y 100% en peso), preferentemente en una cantidad de por lo menos 50% en peso (es decir, entre 50% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 70% en peso (es decir, entre 70% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 90% en peso (es decir, entre 90% y 100% en peso), basado en el peso total del material o extracto vegetal, también se encuentra comprendida en dicha expresión. El término "16-hidroxitotarol" se refiere a 16-hidroxitotarol tanto "natural" (aislado) como "sintético" (artificial). La síntesis del 16-hidroxitotarol se describe en varios artículos, por ejemplo en J. Chem. Soc. (resúmenes), 1553-1560, 1963, y en Chem. & Ind. 44:1760-1761, 1963.

La expresión "metil-éster de ácido totarol-19-carboxílico" se refiere a la mezcla racémica, así como a metil-éster de ácido (4*a*R, 10*a*S)-totarol-19-carboxílico o a metil-éster de ácido (4*a*R, 10*a*S)-totarol-19-carboxílico o a cualquier mezcla o diastereoisómero de los mismos. El metil-éster de ácido totarol-19-carboxílico puede aislarse a partir de madera de especies de *Podocarpus* y de otras plantas. Por lo tanto, cualquier material o extracto de estas plantas o de cualquier otro material o extracto vegetal que contenga metil-éster de ácido totarol-19-carboxílico en una cantidad de por lo menos 30% en peso (es decir, entre 30% y 100% en peso), preferentemente en una cantidad de por lo menos 50% en peso (es decir, entre 50% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 70% en peso (es decir, entre 70% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 90% en peso (es decir, entre 90% y 100% en peso), basado en el peso total del material o extracto vegetal, también se encuentra comprendida en dicha expresión. La expresión "metil-éster de ácido totarol-19-carboxílico" se refiere a metil-éster de ácido totarol-19-carboxílico tanto "natural" (aislado) como "sintético" (artificial). El metil-éster de ácido totarol-19-carboxílico puede prepararse según el procedimiento descrito en Chem. & Ind. 44:1760-1761, 1963.

El término "20-deoxo-camosol" se refiere a la mezcla racémica, así como a (4*a*R, 9*S*, 10*a*S)-20-deoxo-camosol o a (4*a*S, 9*R*, 10*a*R)-20-deoxo-camosol o a cualquier mezcla o diastereoisómero de los mismos. El 20-deoxo-camosol puede aislarse a partir de plantas tales como, aunque sin limitación, *Lepechinia urbaniana* y *Salvia verbenaca*. Por lo tanto, cualquier material o extracto de estas plantas o de cualquier otro material o extracto vegetal que contenga 20-deoxo-camosol en una cantidad de por lo menos 30% en peso (es decir, entre 30% y 100% en peso), preferentemente en una cantidad de por lo menos 50% en peso (es decir, entre 50% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 70% en peso (es decir, entre 70% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 90% en peso (es decir, entre 90% y 100% en peso), basado en el peso total del material o extracto vegetal, también se encuentra comprendida en dicha expresión. La expresión "20-deoxo-camosol" se refiere a 20-deoxo-camosol tanto "natural" (aislado) como "sintético" (artificial).

El término "7-metilrosmanol" se refiere a la mezcla racémica, así como a (4*a*R, 10*S*, 10*a*S)-7-metilrosmanol o a (4*a*S, 9*R*, 10*R*, 10*a*R)-7-metilrosmanol o a cualquier mezcla o diastereoisómero de los mismos. El 7-metilrosmanol puede aislarse a partir de plantas tales como, aunque sin limitación, *Hypptis dilatata*, *Salvia* sp. y *Lepechinia* sp. Por lo tanto, cualquier material o extracto de estas plantas o de cualquier otro material o extracto vegetal que contenga 7-metilrosmanol en una cantidad de por lo menos 30% en peso (es decir, entre 30% y 100% en peso), preferentemente en una cantidad de por lo menos 50% en peso (es decir, entre 50% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 70% en peso (es decir, entre 70% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 90% en peso (es decir, entre 90% y 100% en peso), basado en el peso total del material o extracto vegetal, también se encuentra comprendida en dicha expresión. El término "7-

metilrosmanol" se refiere a 7-metilrosmanol tanto "natural" (aislado) como "sintético" (artificial). La síntesis del 7-metilrosmanol se describe en, por ejemplo, J. Nat. Prod. 65(7):986-989, 2002.

5 La sageona puede aislarse de plantas tales como la salvia y de otras *Salvia* sp. Por lo tanto, cualquier material o extracto de estas plantas o de cualquier otro material o extracto vegetal que contenga sageona en una cantidad de por lo menos 30% en peso (es decir, entre 30% y 100% en peso), preferentemente en una cantidad de por lo menos 50% en peso (es decir, entre 50% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 70% en peso (es decir, entre 70% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 90% en peso (es decir, entre 90% y 100% en peso), basado en el peso total del material o extracto vegetal, también se encuentra comprendida en dicha expresión. El término "sageona" se refiere a sageona tanto "natural" (aislada) como "sintética" (artificial). La síntesis de sageona se describe en, por ejemplo, J. Org. Chem. 62(20):6928-6951, 1997.

15 El término "8,11,13-abietatrién-11,12,20-triol" se refiere a la mezcla racémica, así como a (*4bR*, *8aS*)-8,11,13-abietatrién-11,12,20-triol puro o (*4bS*, *8aR*)-8,11,13-abietatrién-11,12,20-triol puro o cualquier diastereoisómero o mezcla de los mismos. El 8,11,13-abietatrién-11,12,20-triol puede aislarse de plantas, incluyendo de *Salvia* sp. Por lo tanto, cualquier material o extracto de estas plantas o de cualquier otro material o extracto vegetal que contenga 8,11-13,-abietatrién-11,12,20-triol en una cantidad de por lo menos 30% en peso (es decir, entre 30% y 100% en peso), preferentemente en una cantidad de por lo menos 50% en peso (es decir, entre 50% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 70% en peso (es decir, entre 70% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 90% en peso (es decir, entre 90% y 100% en peso), basado en el peso total del material o extracto vegetal, también se encuentra comprendida en dicha expresión. La expresión "8,11,13-abietatrién-11,12,20-triol" se refiere a 8,11,13-abietatrién-11,12,20-triol tanto "natural" (aislado) como "sintético" (artificial).

25 La expresión "ácido roileanónico" se refiere a la mezcla racémica, así como al ácido (*4aR*, *10aS*)-roileanónico puro o al ácido (*4aS*, *10aR*)-roileanónico puro o a cualquier mezcla o diastereoisómero de los mismos. El ácido roileanónico puede aislarse de plantas tales como la salvia (*Salvia* sp.), aunque no se encuentra limitado a la misma.

30 Por lo tanto, cualquier material o extracto de estas plantas o de cualquier otro material o extracto vegetal que contenga ácido roileanónico en una cantidad de por lo menos 30% en peso (es decir, entre 30% y 100% en peso), preferentemente en una cantidad de por lo menos 50% en peso (es decir, entre 50% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 70% en peso (es decir, entre 70% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 90% en peso (es decir, entre 90% y 100% en peso), basado en el peso total del material o extracto vegetal, también se encuentra comprendida en dicha expresión. La expresión "ácido roileanónico" se refiere a ácido roileanónico tanto "natural" (aislado) como "sintético" (artificial).

40 El término "ferruginol" se refiere a (*4bS*, *8aS*)-ferruginol puro o a (*4bR*, *8aR*)-ferruginol puro o a cualquier estereoisómero o mezcla de los mismos. El ferruginol puede aislarse de plantas como *Cryptomeria* sp., *Juniperus* sp. y *Salvia* sp., aunque no se encuentra limitado a ellas. Por lo tanto, cualquier material o extracto de estas plantas o de cualquier otro material o extracto vegetal que contenga ferruginol en una cantidad de por lo menos 30% en peso (es decir, entre 30% y 100% en peso), preferentemente en una cantidad de por lo menos 50% en peso (es decir, entre 50% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 70% en peso (es decir, entre 70% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 90% en peso (es decir, entre 90% y 100% en peso), basado en el peso total del material o extracto vegetal, también se encuentra comprendida en dicha expresión. El término "ferruginol" se refiere a ferruginol tanto "natural" (aislado) como "sintético" (artificial). Se describe la síntesis del ferruginol en Org. Let. 3(11):1737-1740, 2001.

50 Aparte de los compuestos (puros) ácido carnósico, 12-metil-éter de ácido carnósico, ácido 7-oxocalitrísico, totarol, 16-hidroxitotarol, metil-éster de ácido totarol-19-carboxílico, 20-deoxo-carnosol, 7-metilrosmanol, sageona, 8,11-13-abietatrién-11,12,20-triol, ácido roileanónico y ferruginol, resultan especialmente preferentes los materiales y extractos vegetales que contienen por lo menos 30% en peso (es decir, entre 30% y 100% en peso), preferentemente por lo menos 50% en peso (es decir, entre 50% y 100% en peso), más preferentemente por lo menos 70% en peso (es decir, entre 70% y 100% en peso), todavía más preferentemente por lo menos 90% en peso (es decir, entre 90% y 100% en peso) de estos compuestos, basado en el peso total del material/extracto vegetal.

55 Según la presente invención, no sólo los diterpenos tricíclicos tal como se han definido anteriormente, sino también los materiales y extractos vegetales que los contienen en una cantidad de por lo menos 30% en peso (es decir, entre 30% y 100% en peso), preferentemente en una cantidad de por lo menos 50% en peso (es decir, entre 50% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 70% en peso (es decir, entre 70% y 100% en peso), más preferentemente en una cantidad de por lo menos 90% en peso (es decir, entre 90% y 100% en peso), basado en el peso total del material o extracto vegetal, así como las composiciones dietéticas y farmacéuticas que contienen los mismos pueden utilizarse según se reivindica.

En el contexto de la presente invención, el término "tratamiento" también comprende el cotratamiento, así como la prevención. La "prevención" puede ser la prevención de la primera aparición (prevención primaria) o la prevención de una reaparición (prevención secundaria).

5 En el contexto de la presente invención, el término "trastorno" también comprende enfermedades.

10 Los medicamentos/composiciones para el tratamiento de trastornos relacionados con la neurotransmisión alterada comprenden antidepresivos, mejorantes del humor/vitalidad, aliviantes del estrés, mejorantes del estado general, reductores de la ansiedad y reductores del comportamiento obsesivo-compulsivo, relajantes, mejorantes del sueño y/o aliviantes del insomnio. Todos mejoran, incrementan o apoyan la neurotransmisión fisiológica, especialmente en el sistema nervioso central, y por lo tanto alivian la disfunción mental.

15 Los antidepresivos son medicamentos/composiciones para el tratamiento de trastornos mentales, comportamentales y emocionales/afectivos, neuróticos, neurodegenerativos, de alimentación y relacionados con el estrés, tales como, por ejemplo, depresión unipolar, depresión bipolar, depresión aguda, depresión crónica, depresión subcrónica, distimia, depresión postparto, disforia/síndrome premenstrual (SPM), síntomas depresivos climactericos, agresividad, trastornos por déficit de atención (TDA), trastornos de ansiedad social, trastornos afectivos estacionales, ansiedad (trastorno), tal como el trastorno de ansiedad generalizada (TAG), síndrome de fibromialgia, trastornos de estrés post-traumático, trastornos de pánico, trastornos obsesivo-compulsivos, síndrome de las piernas inquietas, nerviosismo, migraña/cefaleas primarias y dolor en general, émesis, bulimia, anorexia nerviosa, trastorno alimentario compulsivo, trastornos gastrointestinales, síndrome del agotamiento profesional e irritabilidad.

20 Los antidepresivos también pueden utilizarse para (la preparación de composiciones para) la prevención primaria y secundaria y/o el tratamiento de las alteraciones neurocognitivas. Además, también resultan eficaces en el tratamiento de síntomas depresivos u otros síntomas relacionados con alteraciones de la neurotransmisión que se producen como comorbilidad en enfermedades crónicas tales como enfermedades cardiovasculares, ictus, cáncer, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y otras.

25 De esta manera, los diterpenos tricíclicos tal como se han definido anteriormente pueden utilizarse en general como antidepresivos para animales, incluyendo seres humanos, preferentemente seres humanos, animales de compañía y animales de granja.

30 En una realización adicional de la presente invención, los diterpenos tricíclicos encuentran utilidad como mejorantes del humor en general, así como para la preparación de composiciones para dicho uso. Las expresiones "mejorante del humor" o "refuerzo del bienestar emocional" o "mejorante de la vitalidad" se refieren a que el humor de una persona tratada con los mismos resulta mejorado, que se incrementa la autoestima y/o que se reducen los pensamientos y/o tensiones negativos. También significa que las emociones resultan equilibradas y/o que se mejora o se mantiene el bienestar mental y la vitalidad, así como que se reduce (ayuda a reducir) el riesgo de cambios de humor y que se conserve (se ayude a conservar) un humor positivo.

35 Los diterpenos tricíclicos tal como se han definido anteriormente pueden utilizarse en general como "reductores de la ansiedad" y/o "reductor del comportamiento obsesivo-compulsivo" para animales, incluyendo seres humanos, preferentemente seres humanos, animales de compañía y animales de granja.

40 La expresión "reductor de la ansiedad" se refiere a que la tensión crónica y la preocupación y tensión ansiosas se alivian o se mitigan. El síndrome de hipervigilancia, incluyendo la inquietud, tensión muscular y problemas de sueño, se reducen o se alivian. Se reducen o se resuelven las fobias sociales y otras. En general, se percibe el entorno social como menos amenazador. La persona se encuentra emocionalmente relajada, experimenta confort y disfruta de la compañía y el contacto con otras personas.

45 Las expresiones "relajante", "mejorante del sueño" o "alivio del insomnio" se refieren a la mejora de la aparición del sueño y la ayuda a que la persona entre fácilmente en el sueño, manteniendo un sueño sin interrupciones durante toda la noche. También se refiere a que las alteraciones del sueño asociadas al ritmo circadiano, debido a jet-lag o al trabajo por turnos, se corrigen y se anulan o se alivian los síntomas asociados a insomnio, es decir, alteraciones de la función cognitiva y la memoria, fatiga mental y física, y somnolencia, y se mejora la calidad de vida y energía vital globales.

50 Además, los diterpenos tricíclicos resultan 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 síntomas relacionados con la sobrecarga de trabajo, el cansancio extremo y/o el agotamiento profesional, para el incremento de la resistencia o la tolerancia al estrés y/o para favorecer y facilitar la relajación en individuos sanos normales, es decir, dichas composiciones presentan un efecto de "alivio del estrés".

Una realización adicional de la presente invención se refiere a la utilización de los diterpenos tricíclicos como "mejorantes del estado general", es decir, medios para reducir la irritabilidad y el cansancio, para reducir o prevenir o aliviar la fatiga física y mental, y para incrementar la energía en términos más generales, especialmente para incrementar la producción de energía mental, en individuos enfermos o sanos normales. Además de para la mejora de la cognición en general, y especialmente para el mantenimiento o mejora de la atención y la concentración, de la memoria y de la capacidad para recordar, de la capacidad de aprendizaje, del procesamiento del lenguaje, de la resolución de problemas y del funcionamiento intelectual, para la mejora de la memoria a corto plazo, para incrementar el nivel de alerta mental, para mantener una función cognitiva equilibrada, para la regulación del hambre y la saciedad, así como para la regulación de la actividad motora.

#### Usos veterinarios

Los animales de compañía y de granja pueden encontrarse en condiciones de necesitar una neurotransmisión incrementada o mejorada. Los animales podrían mostrar reacciones comportamentales y/o fisiológicas adversas a situaciones de estrés; los animales criados en ambientes de producción en masa, o que son transportados bajo condiciones desfavorables, pueden mostrar una caída de la cantidad o calidad de la carne o la leche; las aves estresadas pueden recurrir a estirar de plumas, a reducir la puesta de huevos y al canibalismo. Muchos animales pueden volverse agresivos o mostrar comportamientos estereotipados, ansiosos y obsesivo-compulsivos bajo condiciones de alojamiento o transporte adversas.

De esta manera, otro aspecto de la presente invención son los usos veterinarios de los diterpenos tricíclicos.

En una realización preferente de la presente invención, los diterpenos tricíclicos se administran para evitar el estrés en los animales de granja y cría de ganado de producción en masa, durante el transporte hasta el sacrificio y/o para evitar la pérdida de calidad de la carne de dichos animales de granja bajo dichas circunstancias. Los animales de granja preferentemente son aves de corral, vacas, ovejas, cabras y cerdos.

En otra realización preferente de la presente invención, los diterpenos tricíclicos se administran en las aves de corral para evitar el autodesplumado y el canibalismo, que resultan en, por ejemplo, la reducción de la calidad de la carne y de la producción de huevos.

Otro aspecto de la presente invención son los diterpenos tricíclicos utilizados para evitar y/o aliviar el estrés en la acuicultura, en al que los animales son peces o crustáceos. En otra realización preferente de la presente invención, los diterpenos tricíclicos son utilizados como animales domésticos o de compañía para la reducción del estrés, la tensión y la agresividad, y el comportamiento compulsivo mostrado para condiciones estresantes, tales como la separación, el cambio o pérdida del propietario, durante la separación durante las vacaciones y la cría en los denominados "hoteles para animales" y la cría en albergues o refugios para animales.

Todavía otro aspecto de la presente invención es la utilización de los diterpenos tricíclicos para prevenir/reducir los síntomas asociados a condiciones estresantes en animales utilizados en la industria peletera, preferentemente visones, zorrones y liebres.

La expresión "composiciones dietéticas" comprende cualquier tipo de alimento/pienso y bebidas (fortificadas), incluyendo también la nutrición clínica y también los complementos dietéticos. Las composiciones dietéticas según la presente invención pueden contener además hidrocoloides protectores, ligantes, agentes formadores de películas, agentes/materiales encapsuladores, materiales de pared/concha, compuestos de matriz, recubrimientos, emulsionantes, agentes activos en superficie, agentes solubilizadores (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, portadores, rellenos, co-compuestos, agentes dispersantes, agentes humectantes, adyuvantes de procesamiento (solventes), agentes de flujo, agentes enmascaradores del sabor, agentes de balance de densidad, agentes gelificantes, agentes formadores de gel, antioxidantes y antimicrobianos.

Aparte de un portador farmacéuticamente aceptable y por lo menos un diterpeno tricíclico tal como se ha definido anteriormente, las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden contener además aditivos y adyuvantes farmacéuticos convencionales, excipientes o diluyentes, agentes saborizantes, conservantes, estabilizadores, agentes emulsionantes, tampones, lubricantes, colorantes, agentes humectantes, rellenos y similares. El material portador puede ser un material portador inerte orgánico o inorgánico adecuado para la administración oral/parenteral/inyectable.

Las composiciones dietéticas y farmacéuticas según la presente invención pueden encontrarse en cualquier forma galénica que resulte adecuada para administrar en el cuerpo animal, incluyendo el cuerpo humano, especialmente en cualquier forma que sea convencional para la administración oral, por ejemplo en forma sólida, tal como (aditivos/complementos para) alimentos o piensos, alimentos o premezclas de piensos, alimentos o piensos fortificados, tabletas, píldoras, gránulos, grageas, cápsulas y formulaciones efervescentes, tales como polvos y tabletas, o en forma líquida, tales como soluciones, emulsiones o suspensiones, tales como, por ejemplo, bebidas,

pastas y suspensiones aceitosas. Las pastas pueden utilizarse para rellenar cápsulas de cápsula dura o blanda. Son ejemplos para otras formas de aplicación, las formas para la administración transdérmica, parenteral o inyectable. Las composiciones dietéticas y farmacéuticas pueden encontrarse en forma de formulaciones de liberación controlada (retardada).

5 Son ejemplos de alimentos fortificados, las barras de cereales, e ítems de panadería tales como tartas y galletas.

10 Las bebidas comprenden bebidas no alcohólicas y alcohólicas, así como preparaciones líquidas que deben añadirse a agua de bebida y alimentos líquidos. Las bebidas no alcohólicas son, por ejemplo, refrescos, bebidas deportivas, zumos de frutas, limonadas, bebidas de agua (es decir, bebidas a base de agua con un bajo contenido calórico), té y bebidas a base de leche. Los alimentos líquidos son, por ejemplo, sopas y productos lácteos (por ejemplo bebidas de muesli).

15 Para el ser humano, una dosis diaria adecuada puede encontrarse comprendida entre 0,001 mg por kg de peso corporal y aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal al día. Resulta más preferente una dosis diaria de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal, y resulta especialmente preferente una dosis diaria de entre aproximadamente 0,05 y 5,0 mg por kg de peso corporal. La cantidad de un material vegetal o extracto vegetal que contiene dicho terpeno tricíclico tal como se ha definido anteriormente puede calcularse de acuerdo con lo anterior.

20 En las preparaciones de dosificación unitaria sólida para seres humanos, el diterpeno tricíclico se encuentra presente convenientemente en una cantidad comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 1.000 mg, preferentemente en el intervalo de entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg por cada unidad de dosificación.

25 En composiciones dietéticas, especialmente en alimentos y bebidas para seres humanos, el diterpeno tricíclico se encuentra presente convenientemente en una cantidad comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,0001 (1 mg/kg) y aproximadamente 5% en peso (50 g/kg), preferentemente entre aproximadamente 0,001% (10 mg/kg) y aproximadamente 1% en peso (10 g/kg), más preferentemente entre aproximadamente 0,01 (100 mg/kg) y aproximadamente 0,5% en peso (5 g/kg), basado en el peso total del alimento o bebida.

30 En alimentos y bebidas, en una realización preferente de la invención, la cantidad del diterpeno tricíclico se encuentra comprendida en el intervalo de entre 10 y 30 mg por cada ración, es decir, 120 mg por kg de alimento o bebida.

35 Para animales excluyendo seres humanos, una dosis diaria adecuada del diterpeno tricíclico puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre 0,001 mg por kg de peso corporal y aproximadamente 1.000 mg por kg de peso corporal al día. Resulta más preferente una dosis diaria comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal, y resulta especialmente preferente una dosis diaria de entre aproximadamente 1 y 100 mg por kg de peso corporal.

40 La invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes.

#### 45 Ejemplos

El ácido carnósico utilizado en los experimentos descritos posteriormente se obtuvo de Fluorochem, Wesley Street, Old Glossop, Derbyshire SK13 7RY, Reino Unido. El ácido 7-oxocalitrísico se obtuvo de AnalytiCon Discovery GmbH, Hermannswerder Haus 17, 14473 Potsdam, Alemania, y el totarol, de Aldrich Chemical Company, Inc., 1001 West Saint Paul Avenue, Milwaukee, WI 53233, USA. El 16-hidroxitotarol y el metil-éster de ácido totarol-19-carboxílico se obtuvieron de MicroSource Discovery Systems Inc., 21 George Washington Plaza, Gaylordsville, CT 06755 USA.

50 Las actividades de los neurotransmisores monoamina, serotonina y dopamina, se encuentran regulados por su rápida incorporación y eliminación de las uniones sinápticas por proteínas de transporte de membrana plasmática. Los transportadores monoamina en las neuronas monoaminérgicas centrales son responsables de la recuperación de hasta el 90% del neurotransmisor liberado y son dianas de alta afinidad para varios agentes psicoactivos tales como la cocaína, las anfetaminas y los antidepresivos. Estos agentes, mediante el bloqueo de los transportadores y en consecuencia la prevención de la incorporación neuronal, elevan los niveles de concentración extracelular de los neurotransmisores en los sistemas nerviosos central y periférico, contribuyendo a sus comportamientos sobre el comportamiento y el sistema nervioso autónomo. De esta manera, la inhibición de la incorporación de la serotonina y la dopamina por uno o más de los compuestos de interés se ilustra mediante los dos ejemplos siguientes.

#### 60 Ejemplo 1

Inhibición de la incorporación de la serotonina por diterpenos tricíclicos y sus derivados de fórmula I.

- 5 Las células HEK-293 establemente expresantes del transportador de recaptación de serotonina humana (TRSE\_h)  
 Las células se cultivaron rutinariamente en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Bioconcept) que contenía  
 suero de feto bovino al 10%, penicilina, estreptomina, L-glutamina y el antibiótico G418, y se subcultivaron tras  
 tripsinización. El día del ensayo, las células de matraces confluentes al 80% fueron recolectadas mediante lavado  
 suave con solución salina tamponada con fosfato (PBS) templada. A continuación, las células se lavaron una vez  
 mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón de Krebs-Ringer bicarbonato (Sigma) suplementado con  
 10 pargilina 35 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,2 mM, ácido ascórbico 1 mM y ácido N-2-hidroxi-etil-piperazín-N'-2-etanosulfónico 5 mM  
 (tampón denominado "Hepes") a una densidad de 10.000 células en 160 ml de tampón y se dividieron en alícuotas  
 en placas de microtitulación de 96 pocillos de polipropileno de fondo redondo (Corning) a razón de 10.000 células en  
 cada pocillo. La incorporación de la serotonina en las células se determinó mediante la adición de serotonina  
 15 marcada radioactivamente con [<sup>3</sup>H] (GE Healthcare) a una concentración de 20 nM e incubación durante 40 minutos  
 a 37°C bajo agitación suave. Al final de este tiempo, se eliminó el marcaje no incorporado mediante filtración a través  
 de placas GF/B Unifilter 96 (Perkin Elmer) utilizando un recolector celular Tomtec Mach III M. La serotonina  
 incorporada y retenida sobre las placas se cuantificó mediante recuento de centelleo líquido con Microscint-  
 40/Topcount (Perkin-Elmer).
- 20 El efecto de los diterpenos tricíclicos indicado en la Tabla 1 y del compuesto de referencia, fluoxetina, sobre la  
 incorporación de serotonina se determinó mediante su inclusión en el ensayo en un abanico de concentraciones  
 (diterpenos tricíclicos: 0,003 a 100 mM; fluoxetina: 0,03 nM a 1 mM) durante 10 minutos antes y durante la adición  
 de [<sup>3</sup>H]-serotonina. La incorporación de la serotonina por el transportador resultó inhibida por los diterpenos  
 tricíclicos de una manera dependiente de la dosis. Los valores de IC<sub>50</sub> calculados para la inhibición de la  
 25 incorporación de la serotonina por los diterpenos tricíclicos y de la fluoxetina, se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Inhibición de la incorporación de serotonina en células HEK-293 transfectadas por diterpenos tricíclicos y  
 del compuesto de referencia fluoxetina. Se muestran los resultados como medias ± E.E.M., en caso de que se  
 30 realizasen mediciones repetidas.

Sustancia	IC <sub>50</sub> [mM] para la incorporación de serotonina tritiada
Ácido carnósico	36,4 ± 6,8 (n = 5)
Ácido 7-oxocalitrísico	32,9 ± 8,6 (n = 3)
16-Hidroxitotarol	7,4
Metil-éster de ácido totarol-19-carboxílico	7,2
Totarol	7,5 ± 2,6 (n = 2)
20-Desoxo-carnosol	4,2 ± 0,2 (n = 2)
12-Metil-éter de ácido carnósico	22,0 ± 4,9 (n = 2)
Fluoxetina	5 nM

## Ejemplo 2

Inhibición de la incorporación de dopamina por ácido carnósico

- 35 Antes del ensayo se sembraron en placa células CHO-Ki/DAT\_h que expresaban el transportador de dopamina  
 humano (DAT\_h). Se incubaron células (2x10<sup>5</sup>/ml) con ácido carnósico y/o vehículo en tampón Tris-HEPES  
 modificado, pH 7,1, a 25°C durante 20 minutos antes de la adición de [<sup>3</sup>H]dopamina 50 nM durante 10 minutos. Se  
 determinó la señal específica en presencia de nomifensina 10 mM (inhibidor de la recaptación de dopamina). A  
 40 continuación se solubilizaron las células con tampón de lisis de SDS al 1%. Una reducción de la incorporación de  
 [<sup>3</sup>H]-dopamina de 50 por ciento o más (≥ 50%) respecto a los controles de vehículo indicaba actividad de inhibición  
 significativa. Los compuestos (nomifensina y ácido carnósico) se cribaron a 10 concentraciones gradadas hasta 100  
 mM: 0,00316, 0,01, 0,0316, 0,1, 0,316, 1, 3,16, 10, 31,6 y 100 mM. Estas mismas concentraciones se aplicaron  
 45 concurrentemente a un grupo separado de células y se evaluaron para posible citotoxicidad inducida por  
 compuestos sólo en caso de observarse una inhibición significativa de la incorporación.

**Tabla 2:** Valores de IC<sub>50</sub> medidos para la inhibición de la incorporación de dopamina en células CHO-Ki  
 transfectadas por ácido carnósico y el compuesto de referencia nomifensina.

Compuesto	IC <sub>50</sub>
Ácido carnósico	15 mM
Nomifensina	11 nM

## Ejemplo 3

Inhibición de la monoamina oxidasa por diterpenos tricíclicos

Se utilizaron las aminas orgánicas p-tiramina o bencilamina como sustratos para los enzimas monoamina oxidasa A (MAO-A) y B (MAO-B), respectivamente. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por esta reacción se cuantificó mediante la reacción con ácido vanílico, catalizada por peroxidasa de rábano picante (HRP).

Las reacciones se llevaron a cabo en placas de microtitulación de poliestireno. Los enzimas MAO (concentración final: 2 U/ml) se mezclaron con p-tiramina (Sigma, concentración final: 0,5 mM) o bencilamina (Sigma, concentración final: 0,5 mM) según resultase apropiado, y la solución cromogénica (que contenía ácido vanílico (Fluka), 4-aminoantipirina (Fluka) y peróxidasa de rábano picante (Sigma), concentraciones finales de 0,25 mM, 0,125 mM y 1 U/ml, respectivamente) en tampón de fosfato potásico 0,2 M, pH 7,6. Se realizó un seguimiento de las reacciones en un lector de absorbancia de placas de microtitulación, por ejemplo Spectramax M5 (Molecular Devices Corporation). Se realizaron las lecturas de absorbancia a 495 nm cada 15 segundos durante 40 minutos y se calcularon las velocidades de reacción iniciales mediante regresión lineal utilizando SOFTmaxPro (Molecular Devices Corporation).

El efecto de los diterpenos tricíclicos indicado en la Tabla 3 sobre los enzimas monoamina oxidasa se determinó mediante su inclusión en el ensayo en un intervalo de concentraciones de entre 0,03 y 100 mM durante 10 minutos antes y durante la incubación con sustrato. Para determinar el efecto de los compuestos sobre la parte catalizada por HRP de la reacción, se sustituyó el enzima MAO por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Molecular Probes, concentración final: 0,2 mM). Las reacciones que contenían MAO-A y MAO-B resultaron inhibidas por los diterpenos tricíclicos y sus derivados según la fórmula I de una manera dependiente de la dosis, mientras que la reacción de control no resultó afectada. Los valores de IC<sub>50</sub> medidos para la inhibición de la actividad de monoamina oxidasa por ácido carnósico, 12-metil-éter de ácido carnósico y 20-desoxo-carnosol se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Inhibición de MAO-A y MAO-B por diterpenos tricíclicos. Los resultados mostrados son medias  $\pm$  e.e.m.

Sustancia	IC <sub>50</sub> [mM] para la inhibición de MAO-A	IC <sub>50</sub> [mM] para la inhibición de MAO-B
Ácido carnósico	4,4 $\pm$ 0,3 (n = 3)	8,6 $\pm$ 0,6 (n = 3)
20-Desoxo-carnosol	4,3 $\pm$ 1,1 (n = 2)	27,0 $\pm$ 7,3 (n = 2)
12-Metil-éter de ácido carnósico	40,6 $\pm$ 0,25 (n = 2)	83,1 $\pm$ 6,8 (n = 2)

## Ejemplo 4

## Ensayo de natación de Porsolt

El ensayo de natación forzada (ENT) fue publicado por primera vez en 1977 para el cribado de compuestos de tipo antidepresivo en ratas (Porsolt *et al.*, Nature 266:730-732, 1977) y posteriormente modificado para el ensayo en ratones (Porsolt *et al.*, Arch. Int. Pharmacodynamie 229:327-336). Se demostró "desesperación aprendida", en la que, al ser forzados a nadar en un cilindro de agua del que no había escapatoria, las ratas o ratones inicialmente mostraban una actividad vigorosa orientada a escapar pero finalmente sólo realizaban los movimientos mínimos necesarios para mantener la cabeza sobre el agua. Se demostró que este ensayo era sensible a un abanico de fármacos de actividad terapéutica conocida contra la depresión, algunos de los cuales no habían demostrado eficacia en los modelos de comportamiento existentes.

Ácido carnósico

Se introdujeron ratones individualmente en cilindros (altura: 24,5 cm, diámetro interno: 19,5 cm) que contenían 13,5 cm de profundidad de agua (22  $\pm$  0,5°C) durante un periodo de 6 minutos, analizando los parámetros de comportamiento de interés durante los 4 minutos finales del ensayo, ya que los primeros 2 minutos incluían actividad vigorosa.

Se introdujeron seis cilindros en una caja de metacrilato, permitiendo de esta manera el ensayo simultáneo de seis ratones.

El seguimiento automático de los ensayos de natación resultó posible gracias a la utilización del software VideoMot2 (TSE Technical and Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg, Alemania). Todos los experimentos se observaron mediante una cámara de CCD en blanco y negro. El ensayo: los umbrales de locomoción y parada:inicio, determinados mediante la fijación de parámetros en el programa informático, determinan el número de píxels que deben cambiar para que se registre un movimiento, permitiendo que el software determine si un ratón se encuentra

nadando o en reposo. Entre los parámetros que se registraron automáticamente se incluían: tiempo de descanso y tiempo de locomoción (ms), % de descanso y % de locomoción, distancia recorrida (cm), velocidad de desplazamiento (cm/s) y número de paradas.

- 5 Se evaluó el ácido carnósico a dosis de 10, 20 y 30 mg/kg (i.p., 30 minutos antes del ensayo) y a 200 mg/kg (p.o., 24, 5 y 1 h antes del ensayo) y se comparó con un grupo de control de vehículo y dos compuestos de referencia: el inhibidor selectivo de recaptación de serotonina (SSRI), la fluoxetina (10 mg/kg) y el antidepresivo tricíclico imipramina (32 mg/kg). Los datos se analizaron mediante la comparación de los grupos tratados con el grupo de control no tratado utilizando el ensayo PLSD de Fisher (StatView, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

10

### Resultados

15 **Tabla 4:** Efectos del ácido carnósico, la fluoxetina y la imipramina en el ENF con ratones, tras la administración i.p. (-30 min) o p.o. (-24, -5, -1 h). Se muestra la duración de la inmovilidad en % de cambio respecto al control, en la que \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 (PLSD de Fisher).

15

Tratamiento			Duración de la inmovilidad (% de cambio respecto al control)	
Ácido carnósico	10 mg/kg	i.p., -30 min	-29 %	*
Ácido carnósico	20 mg/kg	i.p., -30 min	-30 %	*
Ácido carnósico	30 mg/kg	i.p., -30 min	-29 %	*
Fluoxetina	10 mg/kg	i.p., -30 min	-41 %	**
imipramina	32 mg/kg	i.p., -30 min	-61 %	***
Ácido carnósico	200 mg/kg	p.o., -24, -5, -1 h	-38 %	**
imipramina	32 mg/kg	p.o., -24, -5, -1 h	-56 %	***

De esta manera, todas las dosis de ácido carnósico sometidas a ensayo en el FST, tras la administración tanto i.p. como p.o., redujeron significativamente el comportamiento de inmovilidad en un grado comparable al de ambos compuestos de referencia, indicando de esta manera una actividad de tipo antidepresivo.

20

### Ejemplo 5

#### Ensayo de enterramiento de canicas

25

Se demostró comportamiento "de enterramiento defensivo" en ratas que enterraban objetos nocivos, tales como surtidores para beber llenos con un líquido de sabor desagradable (Wilkie *et al.*, J. Exp. Anal. Behav. 31:299-306, 1979) o bastones eléctricos (Pinel *et al.*, J. Comp. Phys. Psychol. 92: 708-712, 1978). Se diseñó el ensayo de enterramiento de canicas como modificación de dicho ensayo. Poling *et al.* J. Exp. Anal. of Behav. 35:31-44, 1981, expusieron ratas a jaulas individuales, conteniendo cada una 25 canicas, diariamente durante 10 ó 21 días consecutivos. Se realizó un recuento del número de canicas enterradas, cada día del periodo de 10 días (d) o de 24 horas (h) tras la exposición durante 21 d. Los autores informaron de que el enterramiento de las canicas no estaba determinado por la novedad o a cualesquiera estímulos nocivos.

30

35 Se ha informado de que el comportamiento de enterramiento de canicas en ratones es sensible a un abanico de tranquilizantes menores (por ejemplo diazepam) y mayores (por ejemplo haloperidol) (Broekkamp *et al.*, Eur. J. Pharma. 126:223-229, 1986), además de los SSRI (por ejemplo la fluvoxamina, la fluoxetina y el citalopram), a antidepresivos tricíclicos (por ejemplo la imipramina y la desipramina) y a inhibidores selectivos de recaptación de noradrenalina (por ejemplo la reboxetina), a dosis que no inducen la sedación. El modelo podría reflejar un comportamiento de tipo ansioso u obsesivo-compulsivo (ver De Boer *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 463:145-161, 2003).

40

El método aplicado en la presente memoria siguió lo descrito por Broekkamp *et al.*, *supra*. Se introdujeron ratones (n=15 en cada grupo de tratamiento) individualmente en jaulas de plástico transparente (33x21x18 cm) con 5 cm de serrín sobre el suelo y 25 canicas (diámetro de 1 cm) agrupadas en el centro de la jaula. Una segunda jaula invertida sirvió de tapa. Se realizó un recuento del número de canicas cubiertas con serrín (como mínimo a dos tercios) al final del periodo de ensayo de 30 minutos. Los ensayos fueron realizados por investigadores ciegos al protocolo de tratamiento farmacológico.

45

Antes de los ensayos, todas las jaulas de ensayo y las canicas fueron "impregnadas" dejando 10 ratones no expuestos en cada jaula durante 15 minutos.

50

Se administró ácido carnósico (3, 10 y 30 mg/kg) y 20-desoxi-carnosol (30, 100 y 200 mg/kg) intraperitonealmente (i.p.) 30 minutos antes del ensayo y se comparó con un grupo de control de vehículo. La fluoxetina (32 mg/kg) y la

venlafaxina (16 mg/kg; inhibidor selectivo de recaptación de serotonina/noradrenalina), administradas bajo las mismas condiciones experimentales, fueron utilizadas como sustancias de referencia.

5 Se analizaron los datos mediante comparación de los grupos tratados con control de vehículo utilizando ensayos t de Student no apareados.

Resultados

10 Tabla 5: Efectos del ácido carnósico y la fluoxetina en el ensayo de enterramiento de canicas en el ratón, tras la administración i.p. aguda. Se muestra el número de canicas enterradas como % de cambio respecto al control, en el que NS=no significativo, \*\*\*p<0,001 (prueba t de Student).

Ácido carnósico (mg/kg) i.p., -30 min	NÚMERO DE CANICAS CUBIERTAS DE SERRÍN		
	Media ± e.e.m.	valor de p	% de cambio respecto al control
Vehículo	23,7 ± 0,5	-	-
3	21,9 ± 1,3 (NS)	0,2071	-8%
10	22,7 ± 0,5 (NS)	0,1413	-4%
30	8,7 ± 2,9 (***)	<0,0001	-63%
FLUOXETINA 32 mg/kg i.p. -30 min	0.0 ± 0.0 (***)	<0.0001	-100%

15 La dosis más alta de ácido carnósico sometida a ensayo (30 mg/kg) redujo clara y significativamente el comportamiento de enterramiento de canicas de una manera similar a la SSRI fluoxetina, indicando de esta manera actividad de tipo ansiolítico.

20 Tabla 6: Efectos del 20-desoxi-carnosol y de la fluoxetina en el ensayo de enterramiento de canicas en el ratón, tras la administración i.p. aguda. Se muestra el número de canicas enterradas como % de cambio respecto al control, en el que \*p<0,05, \*\*\*p<0,001 (prueba t de Student).

20-Desoxo-carnosol (mg/kg) i.p., -30 min	NÚMERO DE CANICAS CUBIERTAS DE SERRÍN		
	Media ± e.e.m.	valor de p	% de cambio respecto al control
Vehículo	21,9 ± 0,8	-	-
30	16,7 ± 2,2*	0,0329	-24%
100	9,7 ± 2,3 ***	<0,0001	-56%
200	8,8 ± 2,4 ***	<0,0001	-60%
FLUOXETINA 32 mg/kg i.p., -30 min	0,0 ***	<0,0001	-100%
VENLAFAXINA 16 mg/kg i.p., -30min	8,7 ± 2,2***	<0,0001	-60%

25 El 20-desoxi-carnosol redujo significativamente y de manera dependiente de la dosis el comportamiento de enterramiento de canicas de una manera similar a la SSRI fluoxetina y en el mismo grado que el inhibidor selectivo de recaptación de serotonina/noradrenalina llamado venlafaxina, indicando de esta manera actividad de tipo ansiolítico.

Ejemplo 6

30 Efecto del ácido carnósico en el ensayo de caja de luz-oscuridad con ratones tras la administración con sonda oral subcrónica

El método, que detecta la actividad ansiolítica, sigue lo descrito por Crawley, Pharmacol. Biochem. Behav. 15:695-699, 1981. Los ansiolíticos incrementan el tiempo dedicado en el comportamiento con luz.

35 Se introdujeron animales en el comportamiento con luz de una caja de 2 compartimientos con una mitad iluminada y abierta (25 x 27 x 27 cm) y la otra mitad a oscuras y cerrada (20 x 27 x 27 cm). Se registró el tiempo que pasaban en cada compartimiento, así como el número de veces en que el animal cruzaba de un lado a otro durante un ensayo de 3 minutos. Se estudiaron 15 ratones en cada grupo. El ensayo realizado se realizó bajo condiciones ciegas.

Se evaluó el ácido carnósico a 3 dosis (100, 200 y 400 mg/kg PC), administrados mediante sonda oral (p.o.) 24, 5 y 1 hora antes del ensayo y se compararon con un grupo de control de vehículo (aceite de maíz). El ácido carnósico se disolvió en aceite de maíz ("vehículo"). El clobazam (32 mg/kg p.o.) administrado 1 hora antes del ensayo se utilizó como sustancia de referencia. Los ratones en este grupo recibieron administraciones adicionales de vehículo a las 24 y 5 horas antes del ensayo con el fin de mantener las condiciones experimentales de ciego.

Tabla 7 Efectos del ácido carnósico y el clobazam sobre el comportamiento en un ensayo de caja de luz-oscuridad con ratones, tras la administración p.o. subcrónica. Se muestra el tiempo que pasaron en el compartimiento con luz y el número de cruces como % de cambio respecto al control, en el que NS=no significativo, \*p<0,05, \*\*p<0,01 (prueba t de Student).

TRATAMIENTO (mg/kg) p.o. -24,-5, -1 h	TIEMPO PASADO EN EL COMPARTIMIENTO CON LUZ % de cambio respecto al control	EL	NÚMERO DE CRUCES % de cambio respecto al control	
Ácido carnósico (100)	+19%	NS	+17%	NS
Ácido carnósico (200)	+10%	NS	-21%	NS
Ácido carnósico (400)	+38%	*	+23%	NS
Clobazam (32; -1 h)	+43 %	**	+56%	*

El ácido carnósico (100, 200 y 400 mg/kg) incrementó globalmente el tiempo que pasaban en el compartimiento con luz, en comparación con el control de vehículo (+19%, +10% y +38%, respectivamente) en grado significativamente, al igual que 400 mg/kg (p<0,05). No afectó al número de cruces.

Ejemplo 7

Preparación de una cápsula de gelatina blanda

Se preparó una cápsula de gelatina blanda (500 mg) que comprendía los ingredientes siguientes:

Ingrediente	Cantidad en cada cápsula
Ácido carnósico	200 mg
Lecitina	50 mg
Aceite de soja	250 mg

Pueden administrarse dos cápsulas al día durante 3 meses en un adulto humano para el tratamiento de la distimia crónica leve.

Ejemplo 8

Preparación de una cápsula de gelatina blanda

Se preparó una cápsula de gelatina blanda (600 mg) que comprendía los ingredientes siguientes:

Ingrediente	Cantidad en cada cápsula
Ácido carnósico	200 mg
Aceite de onagra	300 mg
Vitamina B6	100 mg

Debe ingerirse una cápsula al día, preferentemente en la segunda mitad del ciclo menstrual, durante 14 días para el tratamiento del síndrome premenstrual y el trastorno disfórico premenstrual.

Ejemplo 9

Preparación de una tableta

Se preparó una tableta de 400 mg que comprendía los ingredientes siguientes:

Ingrediente	Cantidad en cada tableta
Ácido carnósico	100 mg
Extracto estandarizado de flor de la pasión	150 mg
Extracto de té verde, por ejemplo TEAVIGO® de DSM Nutritional Products,	150 mg

Kaiseraugst, Suiza	
--------------------	--

Para un bienestar general, vigorización y alivio del estrés, se ingiere una tableta dos veces al día durante 3 meses.

Ejemplo 10

5

Preparación de un refresco saborizado instantáneo

Ingrediente	Cantidad [g]
Ácido carnósico	0,9
Sacarosa, polvos finos	922,7
Ácido ascórbico, polvos finos	2,0
Ácido cítrico, polvos anhidros	55,0
Saborizante de limón	8,0
Citrato trisódico, polvos anhidros	6,0
Fosfato tricálcico	5,0
β-Caroteno, CWS al 1% de DNP AG, Kaiseraugst, Suiza	0,4
Cantidad total	1000

10 Se mezclaron todos los ingredientes y se tamizaron por un tamiz de 500 µm. Los polvos resultantes se introdujeron en un recipiente apropiado y se mezclaron en un mezclador tubular durante como mínimo 20 minutos. Para la preparación de la bebida, se enrasaron 125 g de la mezcla de polvos obtenida a un litro de bebida con agua. El refresco listo para beber contenía aproximadamente 30 mg de ácido carnósico por ración (250 ml). Como fortificante y para el bienestar general deben beberse 2 raciones cada día (240 ml).

15 Ejemplo 11

Preparación de una barra fortificada de cereales no horneados

Ingrediente	Cantidad [g]
Ácido carnósico	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
Grasa de palmiste	60,0
Grasa de panadería	40,0
Lecitina	1,5
Aceite de palma endurecido	2,5
Manzana seca y cortada	63,0
Copos de maíz	100,0
Arroz inflado	120,0
Trigo inflado	90,0
Avellana tostada	40,0
Leche desnatada en polvo	45,0
Saborizante de manzana 74863-33	2,0
Ácido cítrico	5,0
Cantidad total	1000

20 Se premezcló el ácido carnósico con leche desnatada en polvo y se introdujo en un mezclador de taza planetario. Se añadieron copos de maíz y arroz inflado y el total se mezcló suavemente. A continuación, se añadieron las manzanas secas y cortadas. En un primer recipiente de cocción se mezclaron azúcar, agua y sal en las cantidades indicadas anteriormente (solución 1). En un segundo recipiente de cocción se mezclaron glucosa, azúcar invertido y jarabe de sorbitol en las cantidades indicadas anteriormente (solución 2). Una mezcla de grasa de panadería, grasa

## ES 2 471 449 T3

de palmiste, lecitina y emulsionante era la fase grasa. Se calentó la solución 1 a 110°C. La solución 2 se calentó a 113°C y después se enfrió en un baño de agua fría. A continuación se agruparon las soluciones 1 y 2.

5 Se fundió la fase grasas a 75°C en un baño de agua. La fase grasa se añadió a la mezcla agrupada de soluciones 1 y 2. Se añadieron saborizante de manzana y ácido cítrico a la mezcla líquida de azúcar-grasa. Se añadió la masa líquida a los ingredientes secos y se mezcló bien en el mezclador de taza planetario. Sobre una placa de mármol se laminó al grosor deseado. Se enfrió la masa hasta la temperatura ambiente y se cortó en trozos. La barra de cereales no horneados contenía aproximadamente 25 mg de ácido carnósico por ración (30 g). Para el bienestar  
10 general y efecto vigorizante deben ingerirse 1 ó 2 barritas de cereales cada día.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Utilización de un diterpeno tricíclico seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido carnósico, 12-metil-éter de ácido carnósico, ácido 7-oxocalitrísico, totarol, 16-hidroxitotarol, metil-éster de ácido totarol-19-carboxílico, 20-desoxo-carnosol, 7-metil-rosmanol, sageona, 8,11,13-abietatrién-11,12,20-triol, ácido royleánico y ferruginol, en la preparación de un medicamento para la utilización como antidepresivo, mejorante del humor/vitalidad, alivante del estrés, mejorante del estado general, reductor de la ansiedad, reductor del comportamiento obsesivo-compulsivo, relajante, mejorante del sueño y/o alivante del insomnio.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el diterpeno tricíclico es ácido carnósico, ácido 7-oxocalitrísico ó 20-desoxo-carnosol.
3. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que la utilización es en el ser humano.
- 15 4. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que la utilización es en animales domésticos y de compañía, o en animales de granja.
- 20 5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el diterpeno tricíclico se presenta en un alimento, pienso, bebida o complemento dietético.
- 25 6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el diterpeno tricíclico se presenta en forma de un alimento, tal como productos lácteos (yogures), en forma de alimentos fortificados, tales como barras de cereales e ítems de panadería tales como tartas y galletas, en forma de complementos dietéticos, tales como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas y formulaciones efervescentes, en forma de bebidas no alcohólicas, tales como bebidas refrescantes, bebidas deportivas, zumos de frutas, gaseosas, bebidas de agua, té y bebidas a base de leche, en forma de alimento líquido, tal como sopas y productos lácteos (bebidas de muesli).

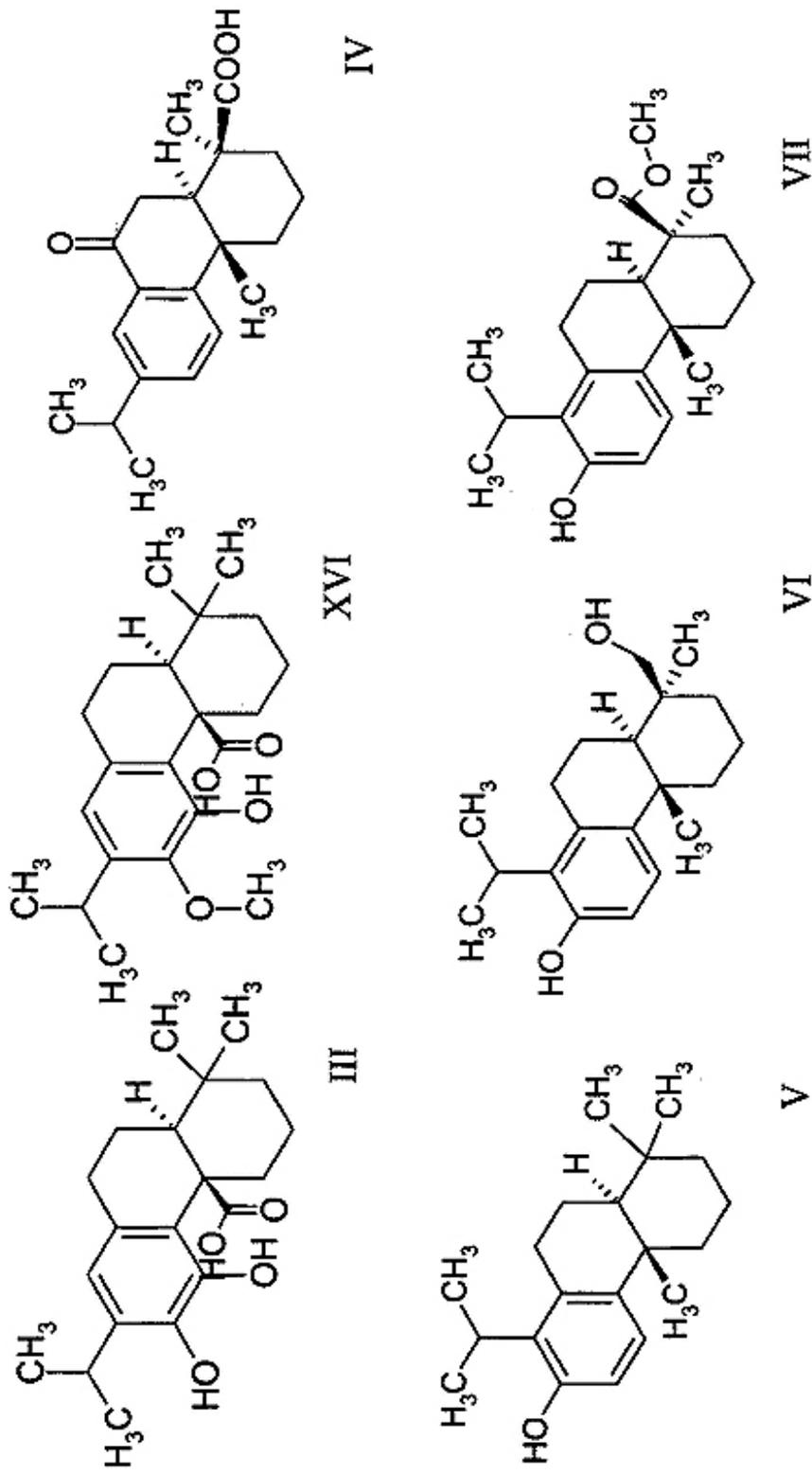


Figure 1

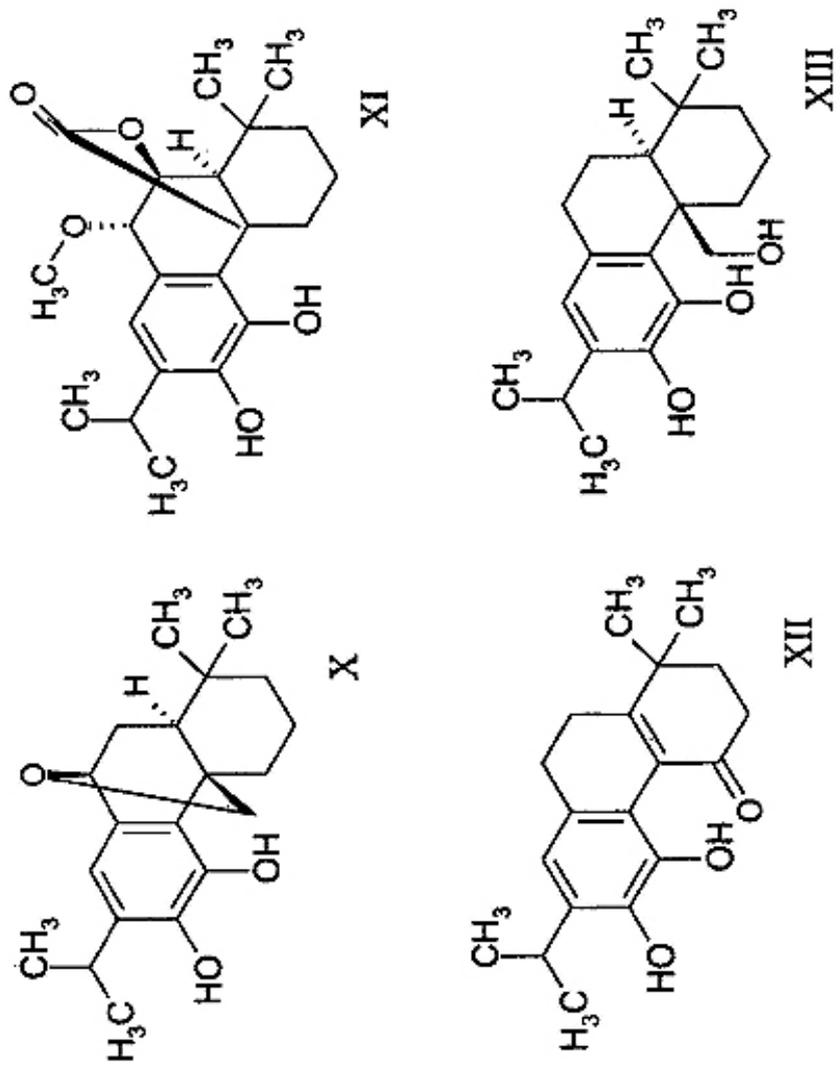


Figura 2

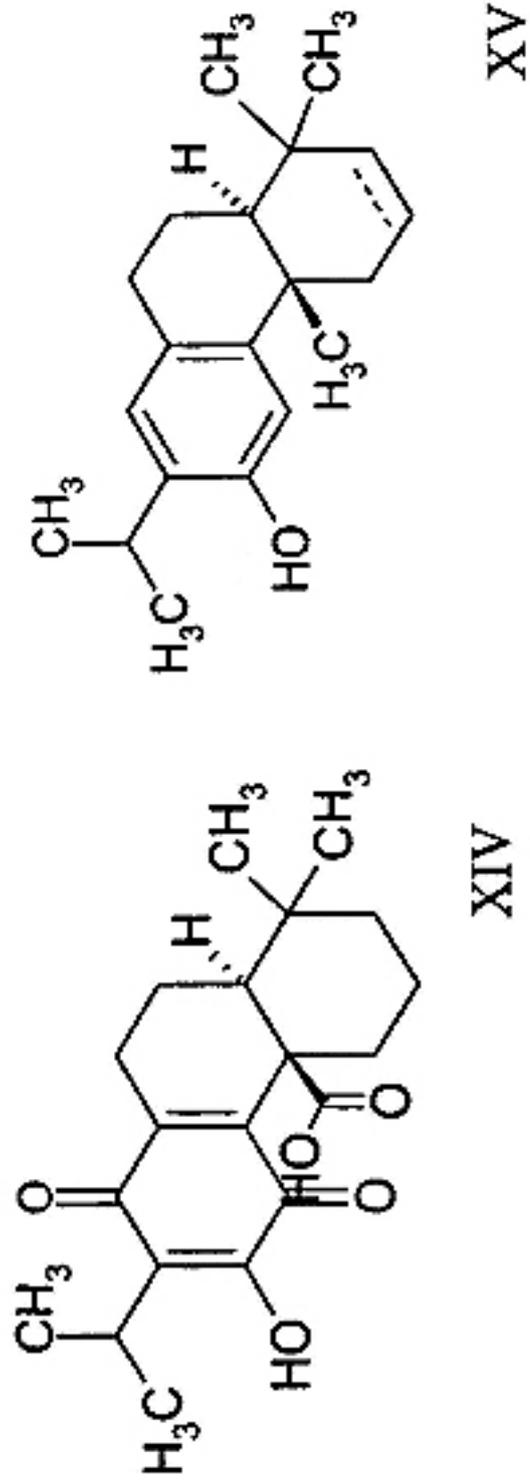


Figura 3