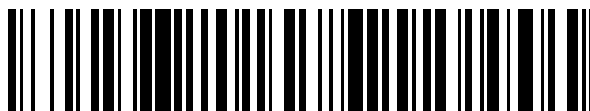


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 116**

51 Int. Cl.:

A61K 31/365 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2007** **E 07856230 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015** **EP 2099318**

54 Título: **Uso de composiciones que contienen carnosol y/o rosmanol**

30 Prioridad:

24.11.2006 EP 06024386

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2015

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (50.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL y
NESTEC S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

FOWLER, ANN;
GORALCZYK, REGINA;
KILPERT, CLAUS;
MOHAJERI, HASAN;
RAEDERSTORFF, DANIEL;
DE SAIZIEU, ANTOINE;
SCHUELER, GOEDE;
WANG-SCHMIDT, YING y
WEHRLI, CHRISTOF

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 549 116 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

Uso de composiciones que contienen carnosol y/o rosmanol

5 Descripción breve de la presente invención

La presente invención se refiere al uso de carnosol y rosmanol como antidepresivos o reductores de la conducta compulsiva obsesiva. En la reivindicación 3 se revelan otros usos no terapéuticos.

10 Antecedentes de la presente invención

Es bien conocido que una neurotransmisión deficiente, p.ej. niveles bajos de neurotransmisor, está relacionada con enfermedades mentales tales como el trastorno de ansiedad generalizada (TAG), mayor susceptibilidad al estrés y disfunción cognitiva.

15 Los compuestos que aumentan los niveles de neurotransmisores en el cerebro y por tanto potencian su transmisión pueden mostrar propiedades antidepresivas y producir efectos beneficiosos en muchos otros trastornos mentales (Neurotransmitters, Drugs and Brain Function R.A. Webster (ed), John Wiley & Sons, Nueva York, 2001, p. 187-211, 289-452, 477-498). Los principales neurotransmisores son: serotonina, dopamina, noradrenalina (= norepinefrina),
20 acetilcolina, glutamato y ácido gamma-aminobutírico (GABA). Los neurotransmisores de especial importancia para los trastornos del estado de ánimo incluyen la serotonina, la noradrenalina y la dopamina, mientras que la neurotransmisión de glutamato y acetilcolina está involucrada en la función cognitiva. Se logra una neurotransmisión potenciada o prolongada aumentando la concentración del neurotransmisor en la hendidura sináptica, inhibiendo su reabsorción en la terminación del nervio presináptico o evitando el catabolismo del neurotransmisor mediante la
25 inhibición de enzimas degradantes tales como las monoamina oxidasas (MAO) A y B. También son interesantes los neuropeptidos, como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)

Antidepresivos y trastornos del estado de ánimo

30 Los antidepresivos tricíclicos (TCA), como la imipramina, la amitriptilina y la clomipramina, inhiben la reabsorción de serotonina y noradrenalina. En general se consideran los antidepresivos más efectivos entre los disponibles, pero tienen varias desventajas porque además interactúan con los receptores muscarínicos de acetilcolina, histamina y serotonina. Como efectos secundarios de dichas actividades cabe mencionar sequedad de boca, visión borrosa, estreñimiento y retención urinaria, además de hipotensión postural. Lo más destacable es que los TCA no son
35 seguros si se toman en cantidad excesiva, pues suelen producir cardiotoxicidad aguda.

Otra clase de fármacos antidepresivos son los llamados inhibidores selectivos de reabsorción de serotonina (ISRS), incluyendo la fluoxetina, la paroxetina, la sertralina, el citalopram y la fluvoxamina, que bloquean el transportador de serotonina (SERT), un transportador de neurotransmisores de gran afinidad, dependiente de cloruro sódico, que
40 finaliza la neurotransmisión serotoninérgica por reabsorción de serotonina. Como los TCA, han resultados efectivos en el tratamiento de la depresión y la ansiedad, pero en general se toleran mejor. Estas medicaciones suelen iniciarse a pequeñas dosis, que se van aumentando hasta alcanzar un nivel terapéutico. Un efecto secundario corriente son las náuseas. Otros posibles efectos secundarios son: pérdida de apetito, sequedad de boca, sudoración, infecciones, estreñimiento, temblor, bostezo, somnolencia y disfunción sexual.

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

50 Por lo tanto los moduladores de neurotransmisión pueden producir efectos pleiotrópicos en las funciones mentales y cognitivas.

Se necesitan compuestos para el tratamiento o prevención de enfermedades mentales y/o trastornos que no tengan los efectos secundarios negativos de los antidepresivos conocidos. Muchos pacientes están interesados en terapias
55 alternativas que puedan minimizar los efectos secundarios relacionados con elevadas dosis de fármacos y aportar beneficios clínicos adicionales. La depresión severa es una enfermedad duradera y recurrente que usualmente se diagnostica mal. Además, muchos pacientes sufren depresión leve o moderadamente grave. Por lo tanto hay un interés creciente en el desarrollo de compuestos y composiciones farmacéuticas y/o dietéticas adecuadas para tratar enfermedades/trastornos mentales o para prevenir el desarrollo de enfermedades/trastornos mentales tales como
60 depresión o distimia en personas de riesgo, a fin de estabilizar el estado de ánimo y lograr equilibrio emocional.

A menudo los pacientes sufren TAG solo o como morbilidad asociada a la depresión. El TAG es un estado de ansiedad y una dolencia crónica que predomina mucho en la atención primaria (~10% de los pacientes) (Wittchen y otros, 2005 Eur. Neuropsychopharm. 15:357-376). Los pacientes acuden a su médico de atención primaria con
65 múltiples síntomas físicos. El TAG se distingue por una tensión y un desasosiego (> 6 meses) discapacitante e incontrolable, que va acompañado por un síndrome característico de hipervigilancia (incluyendo inquietud, tensión

muscular y problemas de sueño). Si no se trata, el TAG sigue un curso crónico fluctuante y tiende a aumentar su gravedad con la edad. Los pacientes de TAG sufren depresión subsindrómica y su impacto total directo e indirecto en la carga económica sanitaria es el más alto de todos los trastornos de ansiedad y depresión. A pesar de la gran incidencia del TAG pocos pacientes son diagnosticados y reciben prescripción médica o son derivados a psiquiatría; se precisan técnicas simples de diagnóstico que ayuden a reconocer y controlar al paciente. Con independencia del diagnóstico específico, los médicos necesitan tratamientos eficaces de los síntomas del TAG. Los ISRS, como la paroxetina, son eficaces para el tratamiento del TAG (Stocchi y otros 2003, J. Clin. Psych., 63(3):250-258). Además las revisiones sistemáticas y los ECA (ensayos clínicos aleatorizados) controlados con placebo indican que algunos ISRS (escitalopram, paroxetina y sertralina), el ISRN (inhibidor selectivo de la reabsorción de noradrenalina) venlafaxina, algunas benzodiazepinas (alprazolam y diazepam), el TCA imipramina y el agonista parcial de 5-HT_{1A} buspirona son todos ellos eficaces en el tratamiento agudo. En general el tratamiento tiene a menudo un efecto moderado y los síntomas reaparecen al interrumpir el periodo de tratamiento. Por tanto un tratamiento o prevención constante durante largo tiempo con compuestos que tengan menos efectos secundarios que los ISRS y que puedan tomarse durante periodos prolongados sería favorable en contraste con el tratamiento a base de fármacos.

Los trastornos del estado de ánimo y el estrés ocupacional pueden producir alteraciones del sueño, insomnio, sueño de baja calidad y perturbaciones generales de los ritmos circadianos (los llamados biorritmos); estas condiciones suelen ser crónicas y de naturaleza persistente. La desregulación de los ritmos circadianos inducida por los vuelos de larga distancia (*jet-lag*) y el trabajo a turnos también puede causar síntomas similares y angustia. Por lo tanto el tratamiento con suplementos dietéticos para mantener un ritmo circadiano normal (al que está acostumbrado una persona o un animal) y/o aliviar y prevenir síntomas relacionados con un ritmo circadiano perturbado, tales como deficiencia de la función cognitiva y memorística y fatiga física y mental, mejorando así la calidad general de vida y favoreciendo la energía vital de una persona necesitada de ella, sería muy deseable.

Conocimiento, aprendizaje y memoria

En el mantenimiento y modulación del estado de ánimo intervienen los sistemas neurotransmisores de serotonina, noradrenalina y dopamina, mientras que la acetilcolina, actuando sobre los receptores nicotínicos y muscarínicos, interviene en los procesos cognitivos, incluyendo la percepción consciente, la atención y la memoria de trabajo. Se sabe que los agonistas colinérgicos mejoran la memoria, mientras que los antagonistas perjudican en general la memoria. Cabe destacar que, además de la implicación de los sistemas receptores de acetilcolina en alteraciones neuropsiquiátricas tales como el trastorno de hiperactividad con déficit de atención y las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, hay pruebas de la potenciación cognitiva mediada por receptores nicotínicos en personas sanas no psiquiátricas, mientras que tras la coadministración de un antagonista muscarínico y nicotínico puede darse una deficiencia cognitiva. Análogamente, la inhibición de la acetilcolinesterasa, el enzima metabolizador de acetilcolina, puede ser efectiva para tratar déficits cognitivos relacionados con la enfermedad de Alzheimer, además de mejorar el rendimiento en sujetos sanos.

Asimismo, la potenciación a largo plazo (PLP), término usado para describir el aumento duradero de la transmisión sináptica y generalmente considerado como uno de los mecanismos principales en la formación y almacenamiento de las memorias en el cerebro, incluye fundamentalmente el complejo receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) y el receptor ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA), ambos fijadores de glutamato, el principal neurotransmisor excitador. Además de glutamato el receptor NMDA requiere un co-agonista, glicina, a fin de modular la función receptora. Los transportadores de glicina (GlyT-1 y -2) juegan un papel importante en la terminación de las acciones glicinérgicas postsinápticas y en el mantenimiento de bajas concentraciones extracelulares de glicina, reabsorbiendo glicina en los terminales nerviosos presinápticos o en células gliales.

Hay un interés creciente en desarrollar compuestos y composiciones nutracéuticas que puedan emplearse para mejorar el aprendizaje, la memoria y el estado de alerta, tanto en personas mayores como en jóvenes que necesitan especialmente mucha memoria y atención en su trabajo diario, incluyendo estudiantes, obreros de la construcción, conductores, pilotos, médicos, agentes de ventas, ejecutivos, amas de casa, "profesionales de alto rendimiento" y personas sometidas a estrés mental o diario, así como aquellas que son propensas a una inestabilidad psiquiátrica, como por ejemplo la esquizofrenia.

Por tanto sería muy conveniente un compuesto o composición nutracéutica que potenciara la función del receptor NMDA, que permite reforzar el aprendizaje, la memoria y el estado de alerta, además de intensificar la actividad de la serotonina, la noradrenalina y la dopamina para mejorar el estado de ánimo.

Descripción detallada de la presente invención

De acuerdo con la presente invención se ha encontrado que puede emplearse carnosol, rosmanol y sus mezclas tal como se revela en las reivindicaciones 1 y 3.

La presente invención también se refiere a un método para el tratamiento de un trastorno relacionado con una neurotransmisión reducida en animales, incluyendo humanos, que comprende la administración de una dosis efectiva de carnosol y/o rosmanol a animales, incluyendo humanos, necesitados de ella.

En el contexto de la presente invención, animales incluye humanos y comprende mamíferos, peces y pájaros. Son animales preferentes las personas, las mascotas, los animales de compañía y los animales de granja. Como ejemplos de mascotas y animales de compañía cabe mencionar perros, gatos, pájaros, peces de acuario, cobayas, conejos (liebre norteamericana), liebres y hurones. Como ejemplos de animales de granja cabe mencionar peces, cerdos, caballos, rumiantes (ganado, ovejas y cabras) y aves de corral.

Descripción breve de las figuras

La FIGURA 1 muestra las estructuras del carnosol (compuesto de la fórmula I) y del rosmanol (compuesto de la fórmula II).

Sobre todo se prefiere el (4*aR*, 9*S*, 10*aS*)-carnosol y el (4*aR*, 9*S*, 10*aS*)-rosmanol.

El término "rosmanol"/"carnosol" también incluye cualquier material o extracto vegetal que lo(s) contenga(n) en una cantidad de al menos 30% en peso (p.ej. del 30 al 100% en peso), preferiblemente de al menos 50% en peso (p.ej. del 50 al 100% en peso), con mayor preferencia de al menos 70% en peso (p.ej. del 70 al 100% en peso), sobre todo de al menos 90% en peso (p.ej. del 90 al 100% en peso) respecto al peso total del material o extracto vegetal. Los términos "material procedente de una planta" y "material vegetal" empleados en el contexto de la presente invención se refieren a cualquier parte de una planta.

"Carnosol" significa tanto la mezcla racémica como el (4*aR*, 9*S*, 10*aS*)-carnosol o el (4*aS*, 9*R*, 10*aR*)-carnosol puros o cualquier mezcla de sus diastereoisómeros. El carnosol se puede aislar de plantas como la salvia, la salvia griega y el romero. Por tanto cualquier material o extracto de estas plantas o cualquier otro material o extracto vegetal que contenga carnosol en una cantidad de al menos 30% en peso (p.ej. del 30 al 100% en peso), preferiblemente de al menos 50% en peso (p.ej. del 50 al 100% en peso), con mayor preferencia de al menos 70% en peso (p.ej. del 70 al 100% en peso), sobre todo de al menos 90% en peso (p.ej. del 90 al 100% en peso) respecto al peso total del material o extracto vegetal, también está incluido en esta expresión. "Carnosol" significa tanto el de tipo "natural" (aislado) como el "sintético" (elaborado).

La síntesis de carnosol está descrita en varios artículos, p.ej. en Tetrahedron 2003, 59(18): 3297-3305.

"Rosmanol" significa tanto la mezcla racémica como el (4*aR*, 9*S*, 10*aS*)-rosmanol o el (4*aS*, 9*R*, 10*aR*)-rosmanol puros o cualquier mezcla de sus diastereoisómeros. El rosmanol se puede aislar de plantas como la salvia, la mejorana, el romero, el tomillo, la *Salvia sp.* y la *Lepechinia sp.* Por tanto cualquier material o extracto de estas plantas o cualquier otro material o extracto vegetal que contenga rosmanol en una cantidad de al menos 30% en peso (p.ej. del 30 al 100% en peso), preferiblemente de al menos 50% en peso (p.ej. del 50 al 100% en peso), con mayor preferencia de al menos 70% en peso (p.ej. del 70 al 100% en peso), sobre todo de al menos 90% en peso (p.ej. del 90 al 100% en peso) respecto al peso total del material o extracto vegetal, también está incluido en esta expresión. "Rosmanol" significa tanto el de tipo "natural" (aislado) como el "sintético" (elaborado).

La síntesis de rosmanol está descrita p.ej. en J. Nat. Prod. 2002, 65(7):986-989.

El carnosol y/o el rosmanol, bien como compuestos puros o como componentes de materiales o extractos vegetales, se pueden usar en composiciones dietéticas y farmacéuticas para el tratamiento de un trastorno relacionado con la neurotransmisión reducida.

En el contexto de la presente invención "tratamiento" también incluye el cotratamiento y la prevención. "Prevención" puede referirse a la primera incidencia (prevención primaria) o a una recurrencia (prevención secundaria).

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un método para la prevención de un trastorno relacionado con la neurotransmisión reducida en animales, incluyendo humanos, que consiste en administrar una dosis efectiva de carnosol o rosmanol o de cualquier mezcla de ellos a los animales, incluyendo humanos, que lo necesiten. En este sentido una dosis efectiva de carnosol y/o rosmanol se puede usar en concreto para mantener el bienestar mental y una función cognitiva equilibrada, para ayudar a disminuir el riesgo de altibajos emocionales y mantener un estado de ánimo positivo y para favorecer la salud mental.

En el contexto de la presente invención el término "trastorno" también incluye las enfermedades.

Los medicamentos/composiciones para el tratamiento de trastornos relacionados con la neurotransmisión reducida incluyen antidepresivos, productos que mejoran el estado de ánimo/la vitalidad, productos que alivian el estrés, la enfermedad, potenciadores cognitivos, reductores de la ansiedad y de conductas obsesivo-compulsivas, relajantes, reparadores del sueño y/o aliviadores del insomnio y del dolor de cabeza y/o de las migrañas. Todos ellos mejoran, potencian y favorecen la neurotransmisión, especialmente en el sistema nervioso central, y por lo tanto alivian la disfunción mental.

Los antidepresivos son medicamentos/composiciones para el tratamiento de los trastornos mentales, conductuales y emocionales/afectivos, neuróticos, neurodegenerativos, trastornos relacionados con la alimentación y el estrés, tales como la depresión unipolar, la depresión bipolar, la depresión aguda, la depresión crónica, la depresión subcrónica, distimia, la depresión postparto, el síndrome de disforia premenstrual (SDPM), los síntomas depresivos climatéricos, la agresión, los trastornos de déficit de atención, de ansiedad social, trastornos afectivos y de ansiedad estacionales tales como el TAG, el síndrome de la fibromialgia, los trastornos de estrés post-traumático, de pánico y obsesivo-compulsivos, el síndrome de las piernas inquietas, nerviosismo, migrañas/dolores de cabeza primarios y el dolor en general, emesis, bulimia, anorexia nerviosa, el trastorno de comer compulsivamente, trastornos gastrointestinales, el síndrome del trabajador quemado y la irritabilidad.

Los antidepresivos también se pueden emplear para la prevención primaria y secundaria y/o para el tratamiento de la deficiencia neurocognitiva o en la preparación de composiciones para dicha finalidad. Además también sirven para tratar síntomas depresivos u otros síntomas relacionados con la neurotransmisión alterada que se manifiesta como comorbilidad en enfermedades crónicas tales como las afecciones cardiovasculares, las apoplejías, el cáncer, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y otras.

El carnosol y/o el rosmanol, así como (mezclas de) los materiales y extractos vegetales que los contienen (sobre todo en una cantidad de al menos 30% en peso, preferiblemente de al menos 50% en peso, más preferiblemente del 70% al 90% en peso, con mayor preferencia de al menos 90% en peso respecto al peso total del material o extracto vegetal) y las composiciones dietéticas/farmacéuticas en que están contenidos sirven por tanto para el tratamiento de los animales, incluyendo humanos.

En otra forma de ejecución de la presente invención el carnosol y/o el rosmanol se pueden usar para mejorar en general el estado de ánimo y también para elaborar composiciones para tal fin (materiales/extractos vegetales que los contienen en una cantidad de al menos 70% en peso, preferiblemente de al menos 90% en peso respecto al peso total del material o extracto vegetal; composiciones dietéticas/farmacéuticas). "Favorecedor del estado de ánimo", "potenciador del bienestar emocional" o "favorecedor de la vitalidad" significa que eleva el estado de ánimo de una persona tratada con él, que aumenta la autoestima y/o que disminuye los pensamientos negativos y/o la tensión pernicioso. También significa que se equilibran las emociones y/o que se mejora o mantiene el bienestar general, sobre todo mental, y la vitalidad, y asimismo se reduce el riesgo de riesgo de altibajos emocionales y se mantiene un estado de ánimo positivo (o contribuye a ello).

El carnosol o el rosmanol o cualquier mezcla de ellos también pueden usarse en general como reductores de la ansiedad y/o de la conducta obsesiva-compulsiva en animales, incluyendo humanos; preferiblemente en personas, mascotas y animales de granja.

"Reductor de la ansiedad" significa que aminora o alivia la tensión crónica y el desasosiego y estrés. El síndrome de hipervigilancia, incluyendo inquietud, tensión muscular y problemas de sueños, se reduce o alivia. La fobia social u otras fobias se reducen o resuelven. En general el ambiente social se experimenta como menos amenazador. La persona está relajada emocionalmente, percibe confort y disfruta de la compañía y del contacto con otra gente.

Asimismo, el carnosol o el rosmanol y las composiciones que contienen una dosis efectiva de él/ellos sirven para tratar, prevenir y aliviar los síntomas asociados al estrés, para tratar, prevenir y aliviar los síntomas relacionados con sobrecarga de trabajo, agotamiento y/o astenia, para aumentar la resistencia o tolerancia al estrés y/o favorecer y facilitar la relajación en individuos normales sanos, es decir, estas composiciones tienen efecto como "calmantes del estrés".

Otra forma de ejecución de la presente invención se refiere al uso del carnosol y/o rosmanol y de las composiciones que lo(s) contienen (materiales/extractos vegetales que lo(s) contienen en una cantidad de al menos 70% en peso, preferiblemente de al menos 90% en peso respecto al peso total del material o extracto vegetal; composiciones dietéticas/farmacéuticas) como "favorecedores del estado", es decir como agentes para reducir la irritabilidad y el cansancio, para reducir, prevenir y aliviar la fatiga física y mental, y para aumentar la energía en general, sobre todo para incrementar la producción de energía cerebral en individuos enfermos o normalmente sanos. Asimismo para mejorar el conocimiento en general, actuando así como "potenciadores cognitivos", y especialmente para mantener o mejorar la atención y la concentración, la memoria y la capacidad de recordar, la capacidad de aprendizaje, el procesamiento del lenguaje, la resolución de problemas y la actividad intelectual; para mejorar la memoria a corto plazo, para aumentar la lucidez; para potenciar la vigilancia mental; para reducir la fatiga mental; para favorecer el bienestar cognitivo y para mantener la función cognitiva equilibrada.

Usos veterinarios

Las mascotas y los animales de granja pueden encontrarse en un estado que requiera potenciar o mejorar la neurotransmisión, lo cual puede facilitar la presente invención. Los animales pueden mostrar un comportamiento adverso y/o reacciones fisiológicas en situaciones estresantes; los animales criados en ambientes de producción en masa o transportados en condiciones desfavorables pueden producir una carne o leche inferior en cantidad o en calidad; las aves de corral estresadas pueden empezar a autodesplumarse, poner menos huevos y al canibalismo.

Muchos animales se pueden volver agresivos o mostrar comportamientos estereotípicos, ansiosos y obsesivo-compulsivos en condiciones adversas de alojamiento o transporte.

Por tanto otro aspecto de la presente invención es el uso veterinario de carnosol y/o rosmanol y de composiciones que lo(s) contenga(n), como preparados dietéticos/farmacéuticos.

En una forma de ejecución preferida de la presente invención el carnosol y/o el rosmanol o los materiales o extractos que los contienen o ambos se administran para prevenir el estrés en animales de granja y en el ganado producido en masa durante el transporte al matadero y/o para evitar la pérdida de calidad de la carne de dichos animales de granja en tales circunstancias. Los animales de granja son preferentemente aves de corral, reses, ovejas, cabras y cerdos.

En otra forma de ejecución preferida de la presente invención el carnosol y/o el rosmanol o los materiales o extractos que los contienen o ambos se administran a las aves de corral para evitar el autodesplumado y el canibalismo, que merma por ejemplo la calidad de la carne y la producción de huevos.

Otro aspecto de la presente invención es un método para prevenir y/o aliviar el estrés en acuicultura, que consiste en administrar carnosol y/o rosmanol o materiales o extractos que los contengan o ambos a animales necesitados de ello, en este caso peces o camarones.

En otra forma de ejecución preferida de la presente invención el carnosol y/o el rosmanol o los materiales o extractos que los contienen o ambos se administran a mascotas o animales de compañía para reducir el estrés, la tensión y la agresividad y el comportamiento compulsivo en condiciones estresantes tales como separación, cambio o pérdida de dueño, durante la separación por vacaciones y la tenencia de los llamados "hoteles de animales" o en albergues o refugios.

Otro aspecto más de la presente invención es un método para prevenir/reducir los síntomas relacionados con las condiciones estresantes de los animales utilizados en la industria peletera, sobre todo visones, zorros y liebres.

Dosis y composiciones preferidas de la presente invención

Según los fines de la presente invención una dosis diaria de carnosol o rosmanol o de cualquier mezcla de ellos adecuada para personas puede estar comprendida en el intervalo de 0,001 mg por kg de peso corporal hasta unos 20 mg por kg de peso corporal. Se prefiere más una dosis diaria de aproximadamente 0,01 hasta unos 10 mg por kg de peso corporal y sobre todo de aproximadamente 0,05 hasta unos 5,0 mg por kg de peso corporal. La cantidad de un material o extracto vegetal que contenga carnosol o rosmanol o ambos puede calcularse correspondientemente.

El término "composiciones dietéticas" comprende cualquier tipo de comida/alimentación y bebidas (reforzadas), incluyendo nutrición clínica y suplementos de la dieta. Las composiciones dietéticas según la presente invención pueden contener además hidrocoloides protectores, aglutinantes, agentes filmógenos, agentes/materiales de encapsulación, materiales formadores de pared/capa, compuestos matriciales, recubrimientos, emulsionantes, agentes surfactantes, agentes solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, soportes, cargas, compuestos auxiliares, agentes dispersantes, agentes humectantes, agentes auxiliares de proceso (disolventes), agentes fluidificantes, agentes enmascaradores del sabor, agentes espesantes, agentes gelatinizantes, agentes gelificantes, antioxidantes y antimicrobianos.

Junto a un soporte farmacéuticamente aceptable y al menos carnosol o rosmanol, las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden contener además aditivos farmacéuticos convencionales y coadyuvantes, excipientes o diluyentes, aromatizantes, conservantes, estabilizantes, agentes emulsionantes, sistemas tampón, lubricantes, colorantes, humectantes, cargas y similares. El soporte puede ser un material inerte de tipo orgánico o inorgánico adecuado para la administración oral/parenteral/inyectable.

Las composiciones dietéticas y farmacéuticas según la presente invención pueden estar en cualquier forma galénica que sea apropiada para administrarlas al cuerpo del animal, incluyendo el cuerpo humano, particularmente en cualquier forma usual de administración oral, p.ej. en forma sólida tal como (aditivos/suplementos para) comida o alimentación, premezcla para comida o alimentación, comida o alimentación reforzada, tabletas, píldoras, gránulos, grageas, cápsulas y formulaciones efervescentes, así como polvos y comprimidos, o en formas líquidas tales como soluciones, emulsiones o suspensiones, como p.ej. bebidas, pastas y suspensiones oleosas. Las pastas pueden introducirse como relleno de cápsulas duras o blandas. Como ejemplos de otras formas de aplicación cabe citar las de administración transdérmica, parenteral o inyectable. Las composiciones dietéticas y farmacéuticas pueden ser formulaciones de liberación controlada (retardada).

Como ejemplos de alimentos reforzados cabe mencionar las barras de cereales y artículos de bollería tales como tortas y galletas.

Las bebidas incluyen las de tipo no alcohólico y alcohólico, así como preparados líquidos para añadir al agua de beber y a los alimentos líquidos. Bebidas no alcohólicas son p.ej. los refrescos, las bebidas deportivas, los zumos de fruta, las limonadas, las bebidas similares al agua (es decir bebidas a base de agua con bajo contenido calórico), los téis y las bebidas lácteas. Los alimentos sólidos son p.ej. las sopas y los productos lácteos (p.ej. bebidas de muesli).

En las preparaciones unitarias de dosificación sólida para humanos el carnosol o el rosmanol o cualquier mezcla de ellos está presente convenientemente en una cantidad comprendida en un intervalo aproximado de 0,1 mg hasta 1000 mg, preferiblemente entre 1 mg y 500 mg por dosis unitaria.

En las composiciones dietéticas, especialmente en alimentos y bebidas para humanos, el carnosol o el rosmanol o cualquier mezcla de ellos está presente convenientemente en una cantidad comprendida en un intervalo aproximado de 0,0001 (1 mg/kg) hasta 5% en peso (50 g/kg), preferiblemente de 0,001% (10 mg/kg) hasta 1%, (10 g/kg), sobre todo de 0,01 (100 mg/kg) hasta 0,5% en peso (5 g/kg) respecto al peso total del alimento o bebida.

En comidas y bebidas el margen es de 10 a 30 mg por porción, es decir de 120 mg por kg de comida o bebida.

Para animales, excluyendo humanos, una dosis diaria adecuada de carnosol o rosmanol o de cualquier mezcla de ellos estaría comprendida en el intervalo de 0,001 mg por kg de peso corporal hasta unos 1000 mg por kg de peso corporal. Se prefiere más una dosis diaria comprendida en el intervalo aproximado de 0,1 mg hasta 500 mg por kg de peso corporal y sobre todo en el intervalo aproximado de 1 mg hasta 100 mg por kg de peso corporal.

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

El carnosol y el rosmanol empleados en los siguientes ensayos fueron sintetizados por químicos de DSM Nutritional Products Ltd., Kaiseraugst, Suiza. Todos los compuestos fueron > 95% puros.

Las acciones de los neurotransmisores monoamínicos serotonina, dopamina y noradrenalina están reguladas por su rápida captación y eliminación de las uniones sinápticas mediante proteínas transportadoras de la membrana plasmática. Los transportadores de monoamina en las neuronas monoaminérgicas centrales son responsables de la recuperación de hasta el 90% de los neurotransmisores liberados y son dianas de gran afinidad para varios agentes psicoactivos como la cocaína, la anfetamina y los antidepresivos. Estos agentes, al bloquear transportadores y evitar por tanto la captación neuronal, elevan los niveles de las concentraciones extracelulares de neurotransmisores tanto en el sistema nervioso central como periférico, contribuyendo a sus efectos conductuales y autónomos. En los tres ejemplos siguientes se ilustra la inhibición de la captación de serotonina, dopamina y noradrenalina por carnosol y/o rosmanol.

Ejemplo 1

Inhibición de la captación de serotonina por carnosol y rosmanol

De R. Blakely, Vanderbilt University, USA se obtuvieron células de riñón embrionario humano (HEK-293), que expresan de modo estable el transportador humano de reabsorción de serotonina (hSERT). Las células se cultivaron rutinariamente en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Bioconcept) que contenía suero bovino fetal dializado al 10% (Invitrogen), penicilina, estreptomina, L-glutamina y el antibiótico G418 y se tripsinizaron. El día del ensayo se recogieron células de 80% de frascos confluentes, lavándolas ligeramente con solución salina caliente tamponada con fosfato (PBS). Luego las células se lavaron una vez por centrifugación y se resuspendieron en tampón de Krebs-Ringer-bicarbonato (Sigma) suplementado con pargilina 35 μ M, CaCl_2 2,2 mM, ácido ascórbico 1 mM y ácido N-2-hidroxiethylpiperazino-N'-2-etanosulfónico (tampón HEPES) 5 mM a una concentración de 10.000 células en 160 μ l de tampón y se repartieron alícuotamente en placas de microvaloración de polipropileno de 96 pocillos de fondo redondo (Corning) a 10.000 células por pocillo. La captación de serotonina en las células se determinó añadiendo serotonina-[H^3] marcada radiactivamente (GE Healthcare) a una concentración de 20 nM e incubando durante 40 minutos a 37°C con agitación suave. Al cabo de este tiempo el marcador no incorporado se eliminó por filtración a través de placas Unifilter 96 GF/B (Perkin Elmer), empleando un recolector celular Tomtec Mach III M. La serotonina incorporada retenida en las placas se cuantificó por centelleo líquido mediante un aparato Microscint-40 / Topcount (Perkin Elmer).

Se determinó el efecto del carnosol, del rosmanol y del compuesto de referencia, la fluoxetina, sobre la captación de serotonina, incluyéndolos en el ensayo según un rango de concentraciones (carnosol y rosmanol: 0,003 - 100 μ M; fluoxetina: 0,03 nM - 1 μ M) durante 10 minutos, antes y durante la adición de serotonina-[H^3]. La captación de serotonina a través del transportador fue inhibida por cada una de dichas sustancias en función de la dosis. En la tabla 1 se indican los valores IC_{50} calculados para la inhibición de la captación de serotonina por cada una de ellas.

Tabla 1: inhibición de la captación de serotonina en células HEK-293 transfectadas por carnosol, rosmanol y el compuesto de referencia fluoxetina. Los datos están indicados como media $\pm$ e.s.m. ($n = 2$).

Compuesto	IC ₅₀
Carnosol	26,6 $\pm$ 6,9 μ M
Rosmanol	23,2 $\pm$ 9,7 μ M
Fluoxetina	5 nM

5 Ejemplo 2

Inhibición de la captación de dopamina por carnosol

Antes del ensayo se cultivaron en placa células ováricas de hámster chino (CHO)-K1 que expresan el transportador humano de dopamina. Las células (2×10^5 /ml) se incubaron con carnosol y/o vehículo en tampón Tris-HEPES modificado (Tris-HCl 5 mM, HEPES 7,5 mM, pH 7,1) - que además contenía NaCl 120 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, D-glucosa 5 mM y ácido ascórbico 1 mM – a 25°C durante 20 minutos, antes de la adición de dopamina-[H³] 50 nM durante 10 minutos. La señal específica se determinó en presencia de nomifensina 10 mM (inhibidor de la reabsorción de dopamina). Después las células se solubilizaron con tampón de lisis SDS al 1%. La reducción de la reabsorción de dopamina-[H³] en un 50 por ciento o más ($\geq 50\%$) respecto a los controles de vehículo indicó una actividad inhibidora importante. El carnosol se probó a diez concentraciones (0,00316 - 100 μ M) y la nomifensina a cinco concentraciones (0,001 – 0,1 μ M). Estas mismas concentraciones se aplicaron de manera simultánea a un grupo separado de células y la posible citotoxicidad inducida por el compuesto solo se valoró en caso de haber observado una inhibición importante de la captación.

Tabla 2: valores IC₅₀ medidos para la inhibición de la reabsorción de dopamina en células CHO-Ki transfectadas por carnosol y el compuesto de referencia nomifensina.

Compuesto	IC ₅₀
Carnosol	10,3 μ M
Nomifensina	0,0104 μ M

25 Ejemplo 3

Inhibición de la captación de noradrenalina por carnosol

Un día antes del ensayo se cultivaron en placa células renales caninas Madin Darby (MDCK), que expresan de manera estable el transportador humano de reabsorción de noradrenalina (hNAT). Las células (2×10^5 /ml) se preincubaron con carnosol y/o vehículo en tampón Tris-HEPES modificado (Tris-HCl 5 mM, HEPES 7,5 mM, pH 7,1) - que además contenía NaCl 120 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, D-glucosa 5 mM y ácido ascórbico 1 mM – a 25°C durante 20 minutos; después se añadió noradrenalina-[H³] 25 nM para 10 minutos de incubación. Las células se lavaron dos veces en cada pocillo, luego se solubilizaron con tampón de lisis SDS al 1% y el lisado se analizó para determinar la captación de noradrenalina-[H³]. La señal específica se midió en presencia de desipramina 10 mM (antidepresivo tricíclico que inhibe la reabsorción de noradrenalina). La reducción de la reabsorción de noradrenalina-[H³] en un 50 por ciento o más ($\geq 50\%$) respecto a los controles de vehículo indicó una actividad inhibidora importante. El carnosol se probó a diez concentraciones (0,00316 - 100 μ M) y la desipramina a cinco concentraciones (0,5 – 50 nM). Estas mismas concentraciones se aplicaron de manera simultánea a un grupo separado de células y la posible citotoxicidad inducida por el compuesto solo se valoró en caso de haber observado una inhibición importante de la captación.

Tabla 3: valores IC₅₀ medidos para la inhibición de la reabsorción de noradrenalina en células MDCK transfectadas por carnosol y el compuesto de referencia desipramina.

Compuesto	IC ₅₀
Carnosol	30,6 μ M
Desipramina	1,93 nM

Ejemplo 4

Inhibición de la monoamina oxidasa por carnosol y rosmanol

Como sustratos para los enzimas monoamina oxidasa A (MAO-A) y B (MAO-B) se utilizaron respectivamente las aminas orgánicas p-tiramina o bencilamina. El H₂O₂ resultante de esta reacción se cuantificó con ácido vainílico catalizado por peroxidasa de rábano picante (HRP).

Las reacciones se efectuaron a 37°C en placas de microvaloración de poliestireno. Los enzimas MAO (concentración final 2 U/ml) se mezclaron correspondientemente con p-tiramina (Sigma, concentración final 0,5 mM) o bencilamina (Sigma, concentración final 0,5 mM) y la solución cromogénica (que lleva ácido vainílico (Fluka), 4-aminoantipirina (Fluka) y peroxidasa de rábano picante (Sigma) a unas concentraciones finales de 0,25 mM, 0,125 mM y 1 U/ml, respectivamente) en tampón de fosfato potásico 0,2 M, de pH 7,6. Después de 40 minutos de incubación las placas se analizaron en un lector de absorbancia de placas de microvaloración, p.ej. un aparato Spectramax M5 (Molecular Devices Corporation), a 495 nm.

Los efectos del carnosol y del rosmanol en los enzimas de monoamina oxidasa se determinaron incluyéndolos en el ensayo a un rango de concentraciones comprendidas entre 0,03 y 100 µM durante 10 minutos antes y durante la incubación con sustrato. Para determinar el efecto de los compuestos en la parte de la reacción catalizada por HRP se reemplazó el enzima MAO por H₂O₂ (Molecular Probes, concentración final 50 µM). Las reacciones que contenían MAO-A y MAO-B fueron inhibidas por carnosol y rosmanol en función de la dosis, mientras que la reacción de control no fue alterada. En la tabla 4 se indican los valores IC₅₀ medidos para la inhibición de la actividad de monoamina oxidasa por carnosol y rosmanol.

Tabla 4: inhibición de MAO-A y MAO-B por carnosol y rosmanol. Los datos están indicados como media ± e.s.m.

Compuesto	MAO-A (IC ₅₀)	MAO-B (IC ₅₀)
Carnosol	4,0 ± 0,1 µM (n = 3)	106,5 ± 19,9 µM (n = 2)
Rosmanol	3,02 ± 0,48 µM (n = 3)	73,3 ± 11,3 µM (n = 2)

Ejemplo 5

Inhibición del transportador 1 de glicina por carnosol y rosmanol

Se cultivaron rutinariamente células CHO que expresan de manera estable el ADNc del transportador humano 1b de glicina (GlyT1) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, USA) que contenía suero bovino fetal dializado al 10%, penicilina, estreptomycin, prolina y el antibiótico G418. Las células se recolectaron por tripsinización un día antes de ensayo y se sembraron en el medio arriba citado. Inmediatamente antes del ensayo el medio se reemplazó por tampón de captación que contenía NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 2,5 mM, glucosa 10 mM y ácido N-2-hidroxietilpiperazino-N'-2-etanosulfónico (tampón HEPES) 10 mM.

La captación de glicina en las células se midió añadiendo glicina-[H³] marcada radiativamente 60 nM (Amersham Biosciences GE Healthcare, Slough, UK) e incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de eliminar el marcador no incorporado lavando tres veces con el tampón anterior, la glicina incorporada se cuantificó mediante recuento por centelleo líquido.

La captación de glicina mediante el transportador GlyT1 fue inhibida por la adición de carnosol (0,00316 - 100 µM) en función de la dosis. En cambio el rosmanol fue inactivo en este ensayo. Como inhibidores conocidos del GlyT1 se usó sarcosina, ORG24598 y ALX5407 (todos procedentes de Sigma, St. Louis, USA). Los valores IC₅₀ medidos para la inhibición de la captación de glicina y las curvas representativas de dosis-respuesta se muestran respectivamente en la tabla 5 y en la figura 2.

Tabla 5: valores IC₅₀ medidos para la inhibición de la captación de glicina por carnosol, rosmanol, sarcosina, ORG24598 y ALX5407 en células CHO.

Compuesto	IC ₅₀ para la captación de glicina tritiada
Carnosol	29,33 µM
Rosmanol	inactivo
Sarcosina	35,9 µM
ORG24598	0,02 µM
ALX5407	6,46 nM

Ejemplo 6

Efectos del carnosol y del rosmanol sobre la PLP en cultivos de cortes de hipocampo

Se decapitaron con una guillotina ratas Wistar de siete días de edad. En menos de 1 minuto se abrió el cráneo, se separaron los hemisferios cerebrales y ambos hipocampos se diseccionaron e introdujeron en tampón enfriado con hielo que contenía NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 0,85 mM, CaCl₂ 1,5 mM, KH₂PO₄ 0,66 mM, MgSO₄ 0,28 mM, MgCl₂ 1 mM, NaHCO₃ 2,7 mM, ácido quinurénico 1 mM y 0,6 % de D-glucosa.

Se prepararon cortes transversales de hipocampo (400 µm), usando un microtomo de cuchilla vibrante (VT1200S; Leica Microsystems (Suiza) AG, Heerbrugg, Suiza) en el mismo tampón. Los cortes de hipocampo se colocaron

individualmente en insertos de membrana (insertos para placas de cultivo Millicell, 0,4 µm) y se cultivaron a 35°C, 5% de CO₂, 95% de humedad en un medio que contenía una mezcla 1:1 de BME y MEM (ambos de Invitrogen) con 25% de suero equino inactivado por calor, 1x GlutaMAX, 1x penicilina/estreptomicina, 0,6 % de glucosa y ácido quinurénico 1 mM (Stoppini, Buchs and Muller (1991), J. Neurosci. Methods, 37(2), 173-82).

Tras 48 h de cultivo los receptores NMDA sinápticos se activaron durante 15 minutos añadiendo carnosol o rosmanol en NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,3 mM, HEPES 25 mM (pH 7,3), D-glucosa 33 mM y metil-yoduro de bicuculina 0,02 mM. Como controles positivos se usaron rutinariamente sarcosina (100 µM) y ALX5407 (20 nM). Un control positivo adicional incluyó la adición de glicina 200 µM a cultivos paralelos. Después de los tratamientos las secciones se lavaron y fijaron para inmunohistoquímica. Se cuantificaron los marcadores de actividad sináptica acentuada, relacionada normalmente con la potenciación a largo plazo, que representan un modelo ex vivo de aprendizaje y memoria (véase la siguiente tabla 6).

Tabla 6: activación relativa de marcadores sinápticos tras el tratamiento con carnosol o rosmanol, en comparación con cultivos paralelos tratados con tampón. La activación de cualquiera de estos marcadores (o de una combinación de ellos) se observa en experimentos clásicos de PLP.

Sustancia	pCREB	pMAPK	GluR1
Carnosol	±	++	608%
Rosmanol	±	+	320%
++++ indica una activación cualitativa máxima, ++ y + significan respectivamente una activación semi-máxima y moderada, mientras que ± significa ningún cambio de inmuno-reactividad; los valores mostrados para GluR1 son porcentajes de los valores de control.			

El tratamiento de los cultivos de hipocampo con carnosol y rosmanol indujo uno o más marcadores bioquímicos típicos de PLP (pCREB: forma activada de la proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc; pMAPK: forma activada de la proteína cinasa activada por mitógenos; GluR1: presencia de receptor AMPA 1 en la superficie celular).

Ejemplo 7

Inhibición del receptor de CGRP por carnosol

El CGRP es un potente vasodilatador en los vasos cerebrales que ha sido involucrado en la patogénesis de las migrañas. El receptor de CGRP abunda especialmente en la vasculatura trigeminal, una red vasos intracraneales asociados con neuronas sensoriales del ganglio trigeminal. La activación de las neuronas sensoriales trigeminales y la liberación de CGRP están fuertemente implicadas en la patofisiología de las migrañas. El bloqueo del receptor de CGRP es efectivo en la prevención y tratamiento de la migraña, del dolor de cabeza y del sofoco menopáusico.

Se investigó el efecto del carnosol sobre el sitio agonista del receptor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina humana (hCGRP) en células CHO transfectadas, llevando a cabo un ensayo de unión de radioligandos adaptado del descrito por Aiyar y otros (1996, J. Biol. Chem., 271: 11325-11329).

En resumen, se incubaron homogenados de membranas celulares (10 µg de proteína) durante 90 minutos a 22°C con hCGRPα-[¹²⁵I] 0,03 nM en ausencia o presencia de carnosol (10 µM) en un tampón que contenía HEPES-NaOH 50 mM (pH 7.4), MgCl₂ 10 mM, KCl 4 mM, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM, 1 fosforamidón µM, BSA al 0,3% y 0,04% de bacitracina. En presencia de h-CGRPα 1 µM se determinó fijación inespecífica. Tras la incubación, las muestras se filtraron rápidamente al vacío a través de filtros de fibra de vidrio (GF/B, Packard), se embebieron previamente en polietilenimina (PEI) al 0,3% y se lavaron varias veces con Tris-HCl 50 mM helado, utilizando un recolector celular de 96 muestras (Unifilter, Packard). Luego los filtros se secaron y se midió su radiactividad en un contador de centelleo (Topcount, Packard), utilizando un cóctel de centelleo (Microscint 0, Packard). Los resultados están expresados como porcentaje de inhibición de la fijación específica del radioligando de control. Como compuesto de referencia estándar se usó h-CGRPα, el agonista natural del receptor de hCGRP.

La unión al receptor de hCGRP fue inhibida notablemente (54%) por carnosol 10 µM. Por consiguiente el carnosol se puede emplear en la prevención y tratamiento de la migraña, del dolor de cabeza y del sofoco menopáusico.

Ejemplo 8

Inhibición de acetilcolinesterasa por carnosol

La función principal de la acetilcolinesterasa es la terminación de la neurotransmisión en las sinapsis colinérgicas por hidrólisis rápida de la acetilcolina. La inhibición de este enzima clave se considera una estrategia útil para tratar la disfunción cognitiva y los trastornos de la memoria.

El efecto del carnosol en la actividad de la acetilcolinesterasa humana recombinante se cuantificó midiendo la formación de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico a partir de acetil-6-metilcolina (AMTCh) según un método adaptado de

Ellman y otros (1961, Biochem. Pharmacol., 7: 88-90). En resumen, se añadió carnosol (10 μ M), un compuesto de referencia o agua (control) a un tampón que contenía $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 200 mM (pH 8,0), 5 mg/ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, DTNB 0,4 mM y 5 mU de enzima. Luego se inició la reacción enzimática añadiendo la sustancia AMTCh a 50 μ M. La absorbancia se midió enseguida ($t = 0$) a $\lambda = 405$ nm con un lector de microplacas (MRX, Dynatech o Ultra, Tecan). Esta medición se utilizó para detectar la interferencia de cualquier compuesto con la detección espectrofotométrica a esta longitud de onda. Tras 30 minutos de incubación a 37°C ($t = 30$) se hizo una segunda medición de absorbancia a $\lambda = 405$ nm. La actividad del enzima se determinó restando la señal medida a $t = 0$ de la señal medida a $t = 30$. Los resultados están expresados como porcentaje de inhibición de la actividad del enzima de control. Como compuesto inhibidor estándar de referencia se usó neostigmina, probada en cada experimento a varias concentraciones para obtener una curva de inhibición a partir de la cual se calculó su valor IC_{50} .

La actividad de la acetilcolinesterasa fue inhibida notablemente (53%) por carnosol 10 μ M. Por consiguiente se demostró que el carnosol es un inhibidor eficaz de la acetilcolinesterasa y se puede usar para prevenir o tratar la disfunción cognitiva leve y la pérdida de memoria.

Ejemplo 9

Prueba de natación de Porsolt

La prueba de natación forzada (PNF) se presentó por primera vez en 1977 para seleccionar compuestos de tipo antidepresivo en ratas (Porsolt y otros. 1977 Nature, 266:730-732) y más tarde se modificó para ratones de ensayo (Porsolt y otros. 1977 Arch. In. Pharmacodynamie, 229:327-336). Se puso de manifiesto un "comportamiento desesperado"; al forzarlas a nadar en un cilindro de agua sin posibilidad de salida, las ratas o los ratones actuaron primero vigorosamente tratando de escapar, pero al final solo hacían los mínimos movimientos necesarios para mantener sus cabezas por encima del agua. Se comprobó que la prueba era sensible a una serie de fármacos de conocida acción terapéutica contra la depresión, algunos de los cuales no habían dado anteriormente muestras de eficacia en los modelos de comportamiento existentes.

En dos experimentos separados se sometieron a la prueba ratones tras la administración i.p. o p.o. de carnosol. Los ratones se introdujeron individualmente en un cilindro lleno de agua (22°C) del cual no podían escapar. Los ratones se mantuvieron en el agua durante 6 minutos y se midió la duración de inmovilidad durante los 4 últimos minutos. Se examinaron diez a quince ratones por grupo. El carnosol se valoró a 3, 10, 30 mg/kg de peso corporal (i.p. 30 min antes de la prueba) o a 200, 400, 600 mg/kg de peso corporal (p.o., 24, 5 y 1 h antes de la prueba) y se comparó con los grupos de control de vehículo. Como sustancia de referencia se empleó imipramina (32 mg/kg i.p. o p.o., respectivamente), administrada en las mismas condiciones experimentales. Se valoró la inmovilidad y el tiempo de natación.

Tabla 7: efectos del carnosol y de la imipramina en la PNF con ratones después de la administración i.p. (-30 min) o p.o. (-24, -5, -1 h). La duración de la inmovilidad se indica como % de cambio respecto al control, donde

NS = no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (prueba t de Student).

Tratamiento			Duración de la inmovilidad (% de cambio respecto al control)	
carnosol	3 mg/kg	i.p., -30 min	-26%	**
carnosol	10 mg/kg	i.p., -30 min	-21%	*
carnosol	30 mg/kg	i.p., -30 min	-18%	*
imipramina	32 mg/kg	i.p., -30 min	-80%	***
carnosol	200 mg/kg	p.o., -24, -5, -1 h	-9%	NS
carnosol	400 mg/kg	p.o., -24, -5, -1 h	-53%	**
carnosol	600 mg/kg	p.o., -24, -5, -1 h	-3%	NS
imipramina	32 mg/kg	p.o., -24, -5, -1 h	-48%	**

Así, tras la administración i.p. todas las dosis de carnosol ensayadas en la PNF disminuyeron significativamente el comportamiento de inmovilidad, mientras que tras la administración p.o. solo la dosis intermedia (400 mg/kg) redujo significativamente la inmovilidad. Por tanto estos datos indican que el carnosol actúa como un antidepresivo.

Ejemplo 10

Prueba de enterrar canicas

La conducta de "enterramiento defensivo" se comprobó en las ratas que enterraban objetos perjudiciales, tales como pitorros llenados con un líquido de sabor desagradable (Wilkie y otros, 1979 J. Exp. Anal. Behav. 31:299-306) o picanas (Pinel y otros, J. Comp. Phys. Psych. 92:708-712). La prueba de enterramiento de canicas fue ideada como una modificación de este tipo de test (Poling y otros, 1981. J. Expl. Anal. Behav. 35:31-44). Las ratas se expusieron diariamente durante 10 o 21 días consecutivos en jaulas individuales que contenían cada una 25 canicas. Se contó el número de canicas enterradas cada día del periodo de 10 d, o 24 tras el periodo de exposición de 21 d. Los

autores refirieron que el enterramiento de canicas no fue determinado por la novedad o debido a cualquier estímulo malsano.

Se ha referido que la conducta de enterramiento de canicas por ratones es sensible a una serie de tranquilizantes menores (p.ej. diazepam) y mayores (p.ej. haloperidol) (Broekkamp y otros, 1986 Eur. J. Pharm., 126:223-229), además de ISRS (p.ej. fluvoxamina, fluoxetina, citalopram), antidepresivos tricíclicos (p.ej. imipramina, desipramina) e inhibidores selectivos de la captación de noradrenalina (p.ej. reboxetina), a dosis que no inducen sedación. El modelo puede reflejar un comportamiento de tipo ansioso u obsesivo-compulsivo (véase De Boer y otros, 2003 Eur. J. Pharm. 463:145-161).

El método aplicado en este caso sigue el descrito por Broekkamp y otros (1986). Los ratones (n = 15 por cada grupo de tratamiento) se alojaron individualmente en jaulas de plástico transparentes (33 x 21 x 18 cm) con 5 cm de serrín en el suelo y 25 canicas (diámetro 1 cm) agrupadas en el centro de la jaula. Como tapa se usó una segunda jaula puesta del revés. Al final de un periodo de ensayo de 30 minutos se contó el número de canicas cubiertas (al menos dos tercios) por serrín. Las pruebas fueron realizadas por investigadores no informados del protocolo de tratamiento.

Antes de la prueba todas las jaulas y canicas del ensayo se "impregnaron" dejando 10 ratones no tratados en cada jaula durante 15 minutos.

Se administró carnosol (3, 10 y 30 mg/kg) y rosmanol (10, 30 y 100 mg/kg) i.p. 30 minutos antes de la prueba y se comparó con un grupo de control de vehículo. Como sustancia de referencia se empleó fluoxetina (32 mg/kg), administrada en las mismas condiciones experimentales.

Tabla 8: efectos del carnosol, rosmanol y fluoxetina en la prueba de enterramiento de canicas realizada con ratones.

La conducta de enterramiento (es decir el número de canicas cubiertas al menos dos tercios por serrín se indica como % de cambio respecto al control, donde NS = no significativo, **p < 0,01, ***p < 0,001 (prueba t de Student).

Tratamiento (i.p., -30 min)		Número de canicas enterradas (% de cambio respecto al control)	
carnosol	3 mg/kg	-12%	NS
carnosol	10 mg/kg	-10%	NS
carnosol	30 mg/kg	-41%	**
rosmanol	10 mg/kg	-21%	NS
rosmanol	30 mg/kg	-12%	NS
rosmanol	100 mg/kg	-55%	***
fluoxetina	32 mg/kg	-92%	***

Las mayores dosis ensayadas de carnosol (30 mg/kg) y rosmanol (100 mg/kg) redujeron clara y significativamente la conducta de enterramiento de canicas de manera similar al ISRS fluoxetina, lo cual demuestra la acción de tipo ansiolítico de ambos compuestos.

Ejemplo 11

Efecto del carnosol en la prueba de las cuatro placas

El método, que detecta la acción ansiolítica, sigue el descrito por Aron y otros (1971, Neuropharmacology, 10:459-469). Los ansiolíticos (benzodiazepinas) aumentan el número de cruces castigados. Los animales se colocaron individualmente en un recinto de plástico blanco que contenía un suelo formado por 4 placas metálicas conectadas a un generador de descargas eléctricas (Apelex: type 011346). Se permitió a cada ratón explorar libremente durante 15 segundos. Luego, cada vez que cruzaba de una placa a otra recibía una descarga eléctrica débil (2,5 mA, 1,5 s). Se contó el número de cruces castigados durante 1 minuto de prueba. Se estudiaron 15 ratones por cada grupo. El ensayo se realizó ciego.

El carnosol se valoró a 3 dosis (200, 400, 600 mg/kg), administradas p.o. 24 h, 5 h y 1 h antes de la prueba y se comparó con un grupo de control de vehículo (aceite de maíz).

Como sustancia de referencia se usó clobazam (32 mg/kg p.o.), administrado 1 h antes de la prueba. Los ratones de este grupo recibieron dosis adicionales de vehículo a las 24 y 5 h antes de la prueba, a fin de mantener el carácter ciego del experimento.

Tabla 9: efectos del carnosol en la prueba de las cuatro placas con ratones. El número de cruces castigados se indica como media $\pm$ e.s.m. y % de cambio respecto al control, donde NS = no significativo, *p < 0,05 y ***p < 0,001 (prueba t de Student).

TRATAMIENTO (mg/kg) p.o. -24 h y -5 h	TRATAMIENTO (mg/kg) p.o. -1 h	NÚMERO DE CRUCES CASTIGADOS					
		media $\pm$ e.s.m.				valor p	% de cambio respecto al control
Vehículo	Vehículo	2,8	$\pm$	0,2		-	-
Carnosol (200)	Carnosol (200)	3,5	$\pm$	0,3	NS	0,0713	+25%
Carnosol (400)	Carnosol (400)	3,7	$\pm$	0,3	*	0,0196	+32%
Carnosol (600)	Carnosol (600)	3,1	$\pm$	0,4	NS	0,4406	+11%
Vehículo	Clobazam	6,1	$\pm$	0,5	***	< 0,0001	+118%

El carnosol (200, 400 y 600 mg/kg) aumentó globalmente el número de cruces castigados en comparación con el control de vehículo (+25%, +32% y +11%, respectivamente), sobre todo a 400 mg/kg ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que el carnosol tiene una acción de tipo ansiolítico débil, pero significativa, a 400 mg/kg p.o.

5

Ejemplo 12

Preparación de una cápsula de gelatina blanda

- 10 Se prepara una cápsula de gelatina blanda que lleva los siguientes ingredientes:

Ingrediente	Cantidad por cápsula
Carnosol o rosmanol	200 mg
Lecitina	50 mg
Aceite de soja	250 mg

Se pueden administrar dos cápsulas diarias durante 3 meses a una persona adulta para el tratamiento de la distimia crónica ligera.

15

Ejemplo 13

Preparación de una cápsula de gelatina blanda

- 20 Se prepara una cápsula de gelatina blanda que lleva los siguientes ingredientes:

Ingrediente	Cantidad por cápsula
Carnosol	100 mg
Rosmanol	100 mg
Aceite de onagra	300 mg
Vitamina B ₆	100 mg

Para el tratamiento del síndrome premenstrual y del trastorno disfórico premenstrual debería tomarse una cápsula diaria durante 14 días, preferiblemente durante la segunda mitad del ciclo menstrual.

25

Ejemplo 14

Preparación de una tableta

- 30 Se prepara una tableta que lleva los siguientes ingredientes:

Ingrediente	Cantidad por tableta
Carnosol o rosmanol	100 mg
Extracto de pasionaria estandarizado	150 mg
Extracto de té verde, p.ej. TEAVIGO® de DSM Nutritional Products, Kaiseraugst, Suiza	150 mg

Para el bienestar general, como vigorizador y alivio del estrés se toma una tableta al día durante 3 meses.

35

Ejemplo 15

Preparación de un refresco instantáneo aromatizado

Ingrediente	Cantidad [g]
Carnosol o rosmanol	0,9
Sacarosa, fina en polvo	922,7
Ácido ascórbico, fino en polvo	2,0

Ácido cítrico anhidro en polvo	55,0
Aroma de limón	8,0
Citrato trisódico anhidro en polvo	6,0
Fosfato tricálcico	5,0
β-Caroteno 1% CWS de DNP AG, Kaiseraugst, Suiza	0,4
Cantidad total	1000

Se mezclan todos los ingredientes y se tamizan a través de un tamiz de 500 µm. El polvo resultante se introduce en un recipiente adecuado y se homogeniza en un mezclador tubular durante al menos 20 minutos. La bebida se prepara añadiendo suficiente agua a 125 g de la mezcla en polvo obtenida, para hacer un litro de bebida.

5 El refresco listo para beber contiene aproximadamente 30 mg carnosol o rosmanol por porción (250 ml). Como reforzante y para el bienestar general deberían beberse 2 porciones (240 ml) diarias.

Ejemplo 16

10 Preparación de una barra de cereales reforzada, sin hornear

Ingrediente	Cantidad [g]
Carnosol o rosmanol	0,95
Azúcar	114,55
Agua	54,0
Sal	1,5
Jarabe de glucosa	130,0
Jarabe de azúcar invertido	95,0
Jarabe de sorbita	35,0
Grasa de nuez de palma	60,0
Grasa de hornear	40,0
Lecitina	1,5
Aceite de palma endurecido	2,5
Manzana seca cortada	63,0
Copos de maíz	100,0
Palomitas de arroz	120,0
Palomitas de trigo	90,0
Avellana tostada	40,0
Leche desnatada en polvo	45,0
Aroma de manzana 74863-33	2,0
Ácido cítrico	5,0
Cantidad total	1000

15 Primero se mezcla el carnosol o el rosmanol con la leche desnatada en polvo y se introduce en el recipiente de un mezclador planetario. Se añaden los copos de maíz y las palomitas de arroz y se mezcla todo suavemente. Luego se agregan las manzanas secas cortadas. En una primera olla de cocción se mezclan las cantidades de azúcar, agua y sal arriba indicadas (solución 1). En una segunda olla de cocción se mezclan las cantidades de jarabe de glucosa, azúcar invertido y sorbita arriba indicadas (solución 2). Una mezcla de grasa de hornear, de grasa de nuez de palma, lecitina y emulsionante constituye la fase lípida. La solución 1 se calienta a 110°C. La solución 2 se calienta a 113°C y luego se enfría en un baño de agua fría. Después se combinan las soluciones 1 y 2. La fase lípida se derrite a 75°C en un baño de agua y se incorpora a la mezcla de las soluciones 1 y 2. El aroma de manzana y el ácido cítrico se añaden a la mezcla líquida azúcar-grasa. La masa líquida se agrega a los ingredientes secos y se mezcla bien en el recipiente del mezclador planetario. La masa se pone encima de una placa de mármol y se le da el grosor deseado con el rodillo. La masa se enfría a la temperatura ambiente y se corta en piezas. La barra de cereal no horneada contiene aproximadamente 25 mg de carnosol o rosmanol por porción (30 g). Para el bienestar general y como vigorizador deberían comerse 1-2 barras de cereal al día.

20

25

REIVINDICACIONES

1. Carnosol y/o rosmanol para usar como antidepresivo o reductor del comportamiento obsesivo-compulsivo.

2. Carnosol y/o rosmanol para usar según la reivindicación 1, de manera que el carnosol y/o el rosmanol está contenido en una composición farmacéutica seleccionada del grupo formado por comida, alimento, productos lácteos, yogurts, comida reforzada, barras de cereales, bollería, pasteles, suplementos dietéticos, tabletas, píldoras, gránulos, grageas, cápsulas, formulaciones efervescentes, bebidas no alcohólicas, refrescos, bebidas deportivas, zumos de fruta, limonadas, bebidas similares al agua, té, bebidas lácteas, alimentos líquidos, sopas y productos lácteos líquidos (bebidas de muesli).

3. Empleo no terapéutico de carnosol y/o rosmanol como favorecedor del estado de ánimo/vitalidad, aliviador del estrés, potenciador del conocimiento, del aprendizaje, del procesamiento del lenguaje, de la resolución de problemas, de la capacidad de superar agobios psicosociales o de la atención, estado de alerta y concentración.

4. Uso según la reivindicación 3, de manera que el carnosol y/o el rosmanol está contenido en una composición dietética escogida del grupo formado por comida, alimento, productos lácteos, yogurts, comida reforzada, barras de cereales, bollería, pasteles, suplementos dietéticos, tabletas, píldoras, gránulos, grageas, cápsulas, formulaciones efervescentes, bebidas no alcohólicas, refrescos, bebidas deportivas, zumos de fruta, limonadas, bebidas similares al agua, té, bebidas lácteas, alimentos líquidos, sopas y productos lácteos líquidos (bebidas de muesli).

5. Carnosol y/o rosmanol para usar según una de las reivindicaciones 1 o 2 o según las reivindicaciones 3 o 4, destinada a mascotas, animales de compañía o animales de granja.

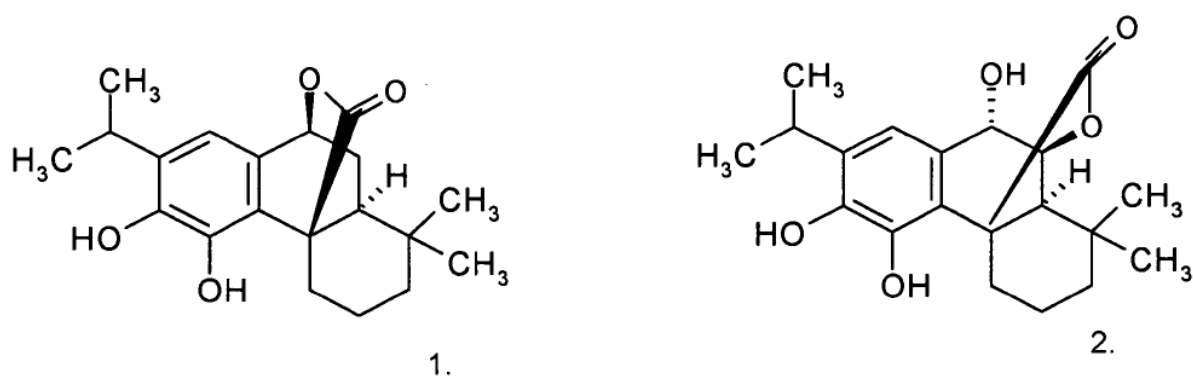


Figura 1: compuestos de la fórmula 1 (carnosol) y 2 (rosmanol)

% de inhibición

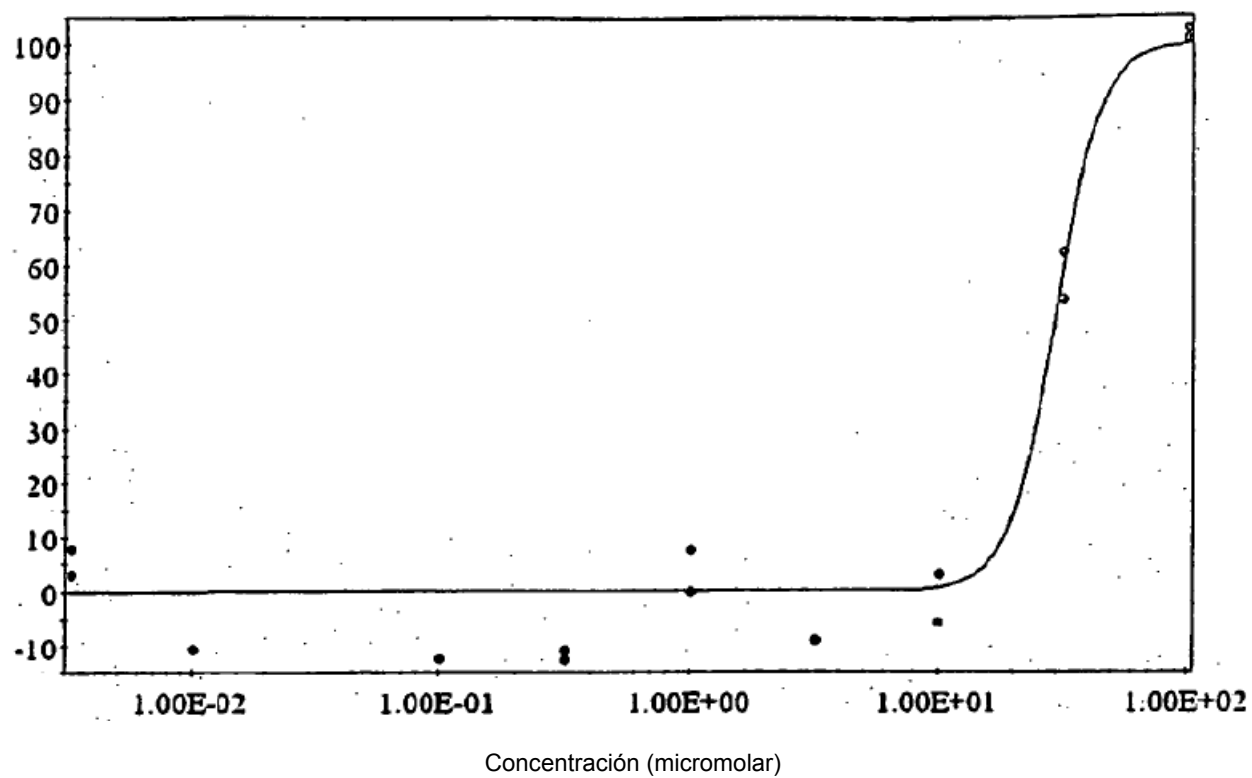


Figura 2A: carnosol

% de inhibición

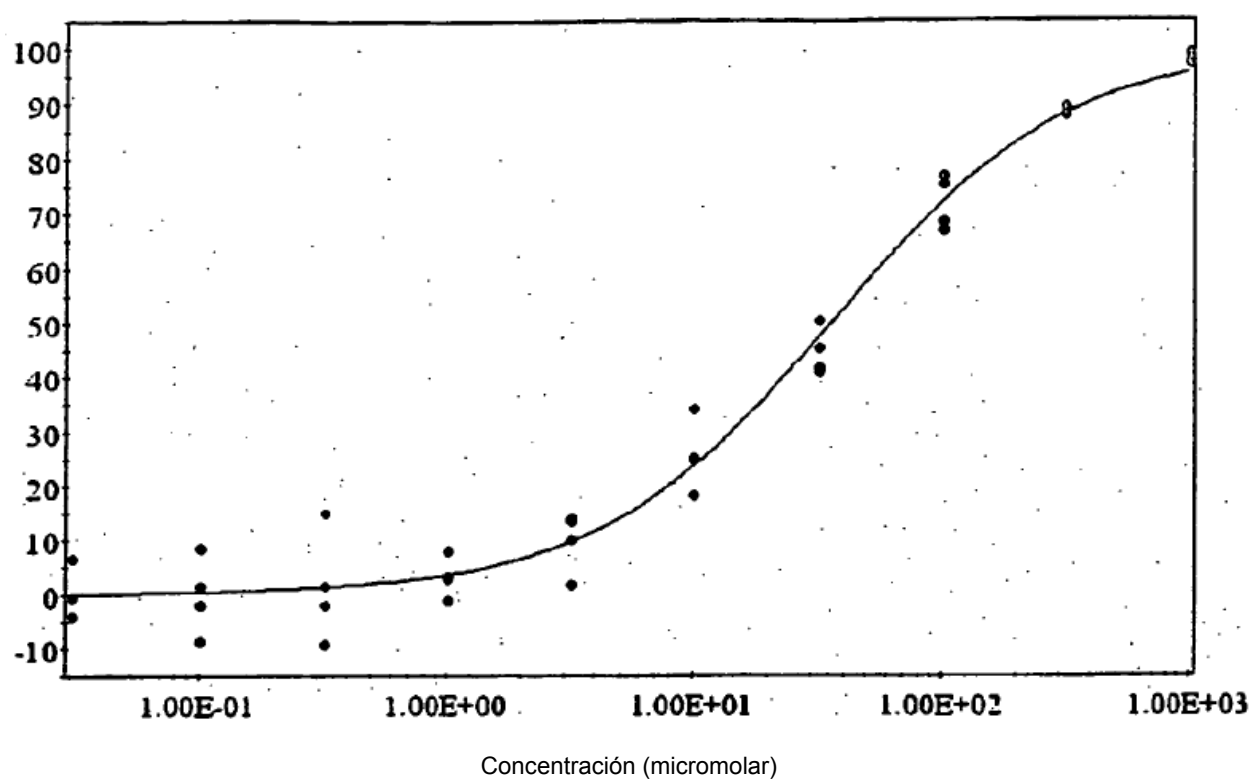
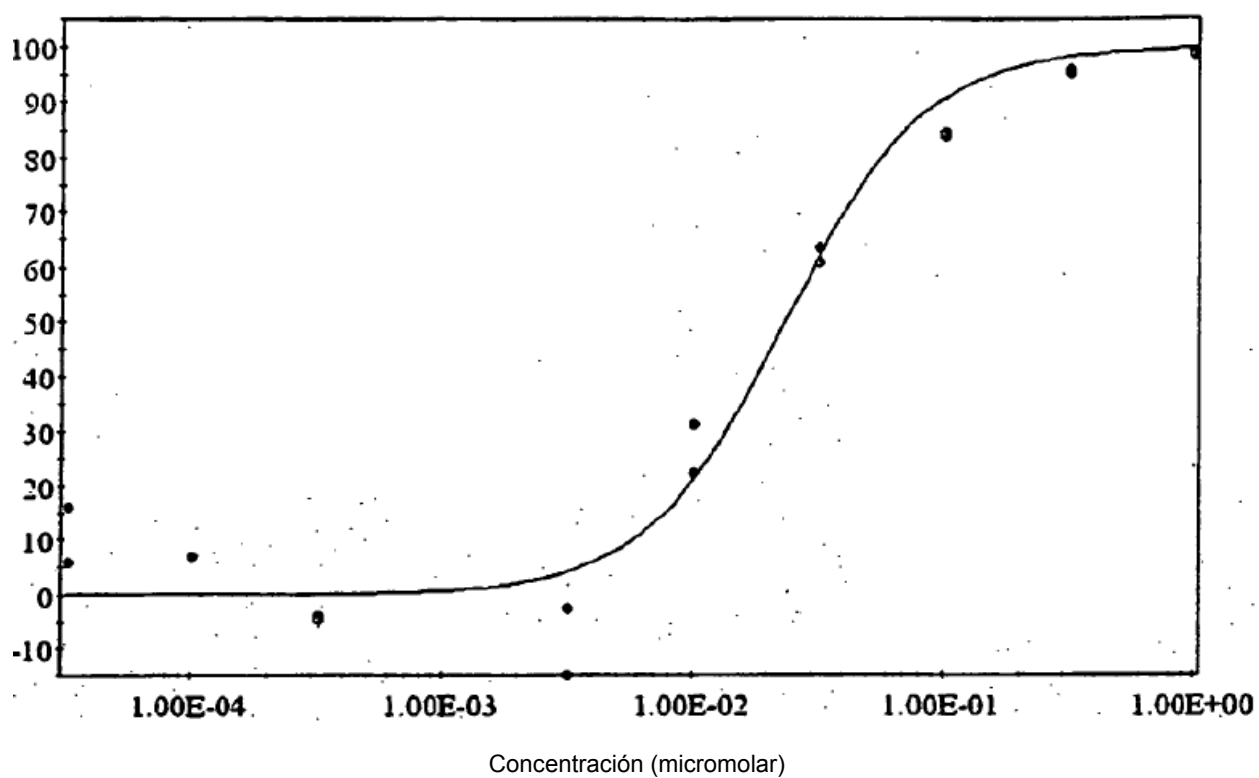


Figura 2B: sarcosina

% de inhibición



% de inhibición

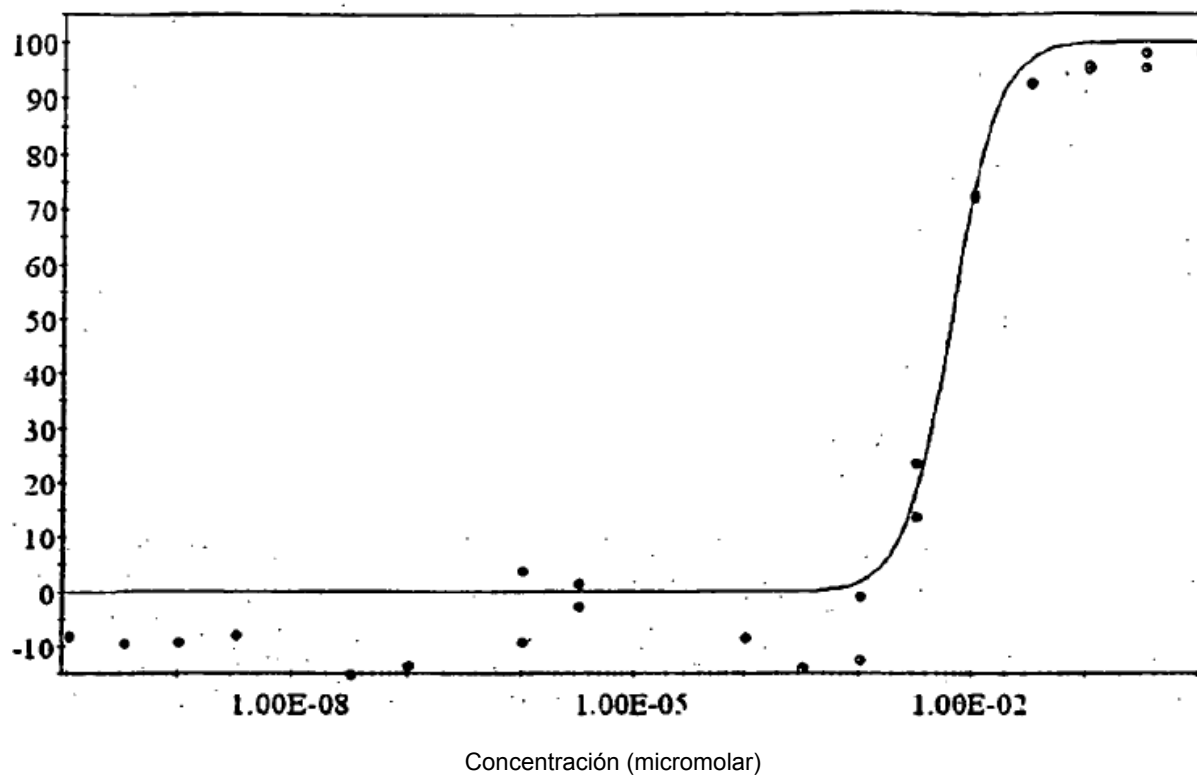


Figura 2D: ALX5407