

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 291**

51 Int. Cl.:

A61K 36/84 (2006.01)

A61P 25/22 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2013** **PCT/EP2013/055087**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013** **WO13143843**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2013** **E 13709193 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018** **EP 2830641**

54 Título: **Nuevos extractos de valeriana y usos de los mismos**

30 Prioridad:

30.03.2012 EP 12002341

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

19.12.2018

73 Titular/es:

BRATTSTRÖM, AXEL (100.0%)
Alexander Puschkin Str. 50
39108 Magdeburg, DE

72 Inventor/es:

BRATTSTRÖM, AXEL

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 694 291 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

Nuevos extractos de valeriana y usos de los mismos

[0001] La presente invención se refiere a un extracto de valeriana para uso en el tratamiento y profilaxis de trastornos relacionados con GABA seleccionados del grupo que consiste en ansiedad, depresión, inquietud e insomnio, en donde la relación de ácido valerénico (VA) a ácido acetoxivalerénico (AVA) en el extracto es de al menos 2:1 en peso. La invención también enseña composiciones farmacéuticas que comprenden tales extractos así como métodos para preparar estos extractos.

Antecedentes de la invención

[0002] La valeriana es uno de los remedios herbales más comúnmente utilizados para el tratamiento del insomnio y la ansiedad. El ácido valerénico (VA) es uno de los muchos compuestos activos de la valeriana. El potencial antiansiedad del VA ha sido verificado por experimentos *in vitro* en el receptor de ácido gamma-aminobutírico tipo A (GABA_A) así como por experimentos *in vivo* en ratones y ratas. La acción del VA en los receptores GABA_A *in vitro* es mediada preferiblemente por las subunidades $\beta 3$ como lo confirman los experimentos *in vivo* que demuestran actividad ansiolítica, porque una mutación puntual en la subunidad $\beta 3$ abolió la respuesta ansiolítica a VA pero no a diazepam.

[0003] GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro. Es esencial para el equilibrio general de la excitación e inhibición neuronal y, por lo tanto, vital para la función normal del cerebro. Un desequilibrio puede causar trastornos relacionados con GABA como ansiedad, depresión, inquietud, sedación e insomnio. Los receptores GABA_A son el sitio de acción para una variedad de agentes farmacológicamente importantes, como benzodiazepinas, barbitúricos, esteroides neuroactivos, anestésicos y anticonvulsivos.

[0004] Se ha demostrado que los extractos de valeriana (VE) modulan de forma alostérica receptores GABA_A y que esta acción está relacionada con el VA. Supuestamente, los receptores GABA_A que contienen subunidades $\beta 2$ o $\beta 3$ son responsables de esta acción. Los derivados del VA, es decir, el ácido acetoxivalerénico (AVA) o el ácido hidroxivalerénico (HVA) no modulan de forma alostérica los receptores GABA_A. Sin embargo, el AVA en concentraciones más altas puede bloquear el canal de GABA_A abierto como el HVA y, además, se ha demostrado que el HVA desplaza al ácido ^3H valerénico de los sitios de unión de la membrana cerebral, indicando por lo tanto que ambos derivados de VA pueden actuar en el sitio de unión idéntico aunque fallan en la modulación alostérica.

[0005] Hoy en día, el VA y sus derivados son los marcadores más utilizados para el análisis cualitativo y cuantitativo de las raíces de valeriana, los rizomas y las VE. Los productos de valeriana generalmente están estandarizados a un porcentaje de VA, definido como la cantidad de VA y AVA y, a veces, también se incluye HVA. Mientras que el VA es estable en el extracto, el AVA se convierte en HVA con el tiempo y dependiendo de las condiciones de almacenamiento. La mayoría de los extractos de valeriana disponibles en la actualidad utilizados para tratamiento médico presentan una relación de VA a AVA de aproximadamente 1:3 a 1:1 en peso.

[0006] El objetivo de la presente invención es proporcionar extractos de valeriana y composiciones farmacéuticas mejoradas basadas en estos extractos de valeriana. Otro objetivo preferido es proporcionar medicamentos mejorados para su uso en el tratamiento y la profilaxis de trastornos relacionados con GABA, en particular los trastornos de ansiedad, depresión, inquietud e insomnio relacionados con GABA_A.

[0007] Los objetos anteriores se resuelven con un extracto de valeriana para su uso en el tratamiento y la profilaxis de trastornos relacionados con GABA seleccionados del grupo que consiste en ansiedad, depresión, inquietud e insomnio, en donde la relación de ácido valerénico (VA) a ácido acetoxivalerénico (AVA) en el extracto es de al menos 2:1 en peso.

[0008] Sorprendentemente, se encontró que los extractos de valeriana presentan una relación de VA a AVA de al menos 2:1 en peso objetivo y afectan al receptor GABA de manera más eficiente que los extractos comúnmente usados en la técnica, que regularmente presentan una relación de 1:3 a 1:1 en peso. La relación del extracto de la invención tiene además la ventaja de que el contenido global de ácido valerénico y derivados del ácido valerénico se puede reducir significativamente, evitando así los efectos secundarios típicos que acompañan a la intoxicación.

[0009] En una realización más preferida, el extracto para uso de acuerdo con la invención es uno, en donde la relación de ácido valerénico (VA) a ácido acetoxivalerénico (AVA) en el extracto es de al menos 3:1, preferiblemente al menos 4:1, más preferiblemente al menos 10:1, muy probablemente al menos aproximadamente 12:1 en peso.

[0010] El término "extracto de valeriana" como se usa en el presente documento se define como cualquier producto de extracción a partir de raíces y rizomas de valeriana que comprende al menos sesquiterpenos de valeriana (al menos VA y AVA), así como cantidades detectables de al menos uno, preferiblemente más de flavonoides, triterpenos, lignanos, alcaloides y aminoácidos, preferiblemente sesquiterpenos de valeriana y cantidades detectables de flavonoides, triterpenos, lignanos, alcaloides y aminoácidos.

[0011] Preferiblemente, el extracto de valeriana es el resultado de la extracción a partir de raíces y/o rizomas de valeriana con solventes lipofílicos, preferiblemente con solventes al menos parcialmente lipofílicos, más

preferiblemente un solvente seleccionado del grupo que consiste en éter de petróleo, acetato de etilo y/o alcoholes acuosos, los así llamados hidroalcoholes, preferiblemente metanol o etanol acuoso, más preferiblemente etanol acuoso. El término extracto lipofílico, como se usa en este documento, se refiere a un extracto de valeriana producido con un disolvente lipofílico o un disolvente al menos parcialmente lipofílico, por ejemplo, los disolventes mencionados anteriormente, que son adecuados para solvatar ácido valerénico. Un disolvente lipofílico o parcialmente lipofílico para practicar la presente invención excluye el agua pura, pero incluye cualquier disolvente y mezclas de disolventes que solvaten y extraigan sustancialmente ácido valerénico. El disolvente puede ser más lipofílico, por ejemplo éter de petróleo, o menos lipofílico, por ejemplo, hidroalcoholes. Por ejemplo, se prefiere un disolvente de 70% de etanol acuoso o de 50% de metanol acuoso para extraer ácido valerénico. Sin embargo, un disolvente más polar, es decir, hidrófilo, por ejemplo, es poco probable que el hidroalcohol al 30% extraiga suficiente ácido valerénico para producir un extracto de valeriana para la práctica de la presente invención. La preparación de extractos de valeriana que contienen ácido valerénico se ha publicado abundantemente en la técnica, por ejemplo, en European Pharmacopoeia Supplement 5.7. Valerian dry hydroalcoholic extract (1898). Hoy en día, los extractos de valeriana para uso médico se preparan regularmente mediante extracción con hidroalcoholes con un contenido de alcohol entre 40 y 80%. El experto en la materia puede seleccionar fácilmente disolventes adecuados para preparar el extracto de valeriana para su uso en la presente invención.

[0012] Los inventores han realizado una amplia selección de plantas de valeriana y hasta ahora han identificado una planta de valeriana que produce de forma natural ácido valerénico en un contenido mucho más alto que sus derivados. Esta planta única se multiplicó para permitir la producción de cantidades de extracto de VE que permiten validación experimental *in vivo* de su utilidad y ventajas farmacéuticas.

[0013] Alternativamente, los extractos de valeriana para uso en la presente invención se pueden preparar ya sea reduciendo el contenido de AVA, por ejemplo, mediante el fraccionamiento de un extracto estándar, o bien aumentando artificialmente el contenido de ácido valerénico, por ejemplo, añadiendo un extracto estándar con VA sintético, aislado y/o concentrado.

[0014] El extracto para uso de acuerdo con la presente invención es particularmente adecuado para modular receptores GABA_A, más preferiblemente receptores GABA_A que contienen subunidades $\beta 2$ o $\beta 3$. En una realización preferida, la invención se refiere al extracto de valeriana de la invención para uso en el tratamiento y profilaxis de trastornos relacionados con GABA_A, preferiblemente trastornos relacionados con receptores GABA_A que contienen subunidades $\beta 2$ o $\beta 3$.

[0015] En un aspecto adicional, la presente invención está dirigida al uso del extracto de valeriana anterior para la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento y profilaxis de trastornos relacionados con GABA_A, seleccionados preferiblemente del grupo que consiste en ansiedad, depresión, inquietud e insomnio.

[0016] Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un extracto de valeriana de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden típicamente una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un extracto de valeriana de acuerdo con la invención y opcionalmente sustancias auxiliares tales como excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Además, la composición farmacéutica puede comprender componentes de extracto y/o agentes médicamente activos adicionales.

[0017] Más preferiblemente, la composición farmacéutica también comprende al menos un extracto seleccionado del grupo de extractos producidos a partir de toronjil [melisa], lúpulo y flor de la pasión. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende además extractos producidos a partir de toronjil [melisa], lúpulo y flor de la pasión.

[0018] Un aspecto adicional de la presente invención es un método para preparar un extracto de valeriana que comprende las etapas de:

a) seleccionar raíces y/o rizomas de valeriana, en donde la relación de ácido valerénico (VA) a ácido acetoxivalerénico (AVA) es al menos 2:1 o al menos 3:1, preferiblemente al menos 4:1, más preferiblemente al menos 10:1, muy probablemente al menos aproximadamente 12:1 en peso.

b) extraer el ácido valerénico (VA) y el ácido acetoxivalerénico (AVA) de las raíces y/o los rizomas utilizando un disolvente adecuado,

c) opcionalmente, procesar adicionalmente el extracto crudo para que sea adecuado para la administración humana.

[0019] Preferiblemente, el disolvente adecuado es lipofílico, más preferiblemente al menos parcialmente lipofílico, siendo lo más preferible un disolvente como se mencionó anteriormente. El experto en la materia puede seleccionar rutinariamente raíces y/o rizomas de valeriana que tengan la relación requerida de AV con respecto a AVA. Se mencionaron ejemplos de tales plantas de valeriana, anteriormente y en los ejemplos a continuación. Además, el experto en la materia conoce los disolventes adecuados para la extracción de valeriana, por ejemplo, éter de petróleo, acetato de etilo e hidroalcoholes.

[0020] El extracto lipofílico puede y, con mayor frecuencia, se procesa adicionalmente para hacerlo adecuado para la administración humana, es decir, se cuantifica, por ejemplo, se estandariza con respecto a VA, AVA y otros componentes de la valeriana, y es formulado para la dosis terapéutica o profilácticamente efectiva, para la estabilidad en almacenamiento y la ruta particular de administración, preferiblemente administración oral.

5 **[0021]** Un método preferido adicional para preparar un extracto de valeriana de la invención comprende las etapas de:

a) proporcionar raíces y/o rizomas de valeriana,

b) extraer el ácido valerénico (VA) y el ácido acetoxivalerénico (AVA) de las raíces y/o los rizomas utilizando un disolvente adecuado,

10 c) adaptar el contenido de ácido valerénico (VA) y ácido acetoxivalerénico (AVA) en el extracto de modo que la relación de ácido valerénico (VA) a ácido acetoxivalerénico (AVA) sea al menos 2:1 o al menos 3:1, preferiblemente al menos 4:1, más preferiblemente al menos 10:1, muy probablemente al menos aproximadamente 12:1 en peso y

d) opcionalmente, continuar procesando el extracto para hacerlo adecuado para la administración humana.

15 **[0022]** Preferiblemente, el disolvente adecuado es lipofílico, más preferiblemente al menos parcialmente lipofílico, siendo lo más preferible un disolvente como se mencionó anteriormente. Por ejemplo, el contenido de VA y AVA en el extracto se puede adaptar a la relación deseada mediante la adición de VA y/o la reducción de AVA. Por ejemplo, se puede agregar al extracto VA sintético, aislado y/o concentrado hasta que se alcance la relación deseada de A a VA de la invención. El modo de administración preferido es oral. Preferiblemente, las raíces de valeriana y/o los rizomas son de *Valeriana officinalis* L.

20 **[0023]** En el presente documento también se describe un método para el tratamiento y la profilaxis de trastornos relacionados con GABA_A, que comprende la etapa de administrar un extracto de valeriana a un paciente que lo necesite, en donde la relación de ácido valerénico (VA) a ácido acetoxivalerénico (AVA) en el extracto es de al menos 2:1 o al menos 3:1, preferiblemente al menos 4:1, más preferiblemente al menos 10:1, muy probablemente al menos aproximadamente 12:1 en peso.

25 **[0024]** Para uso terapéutico o profiláctico, los extractos de la invención pueden administrarse en cualquier forma de dosificación convencional de cualquier manera convencional. Las vías de administración incluyen, pero no se limitan a, por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, por infusión, sublingual, transdérmica, oral, rectal y tópica. El modo preferido de administración es oral, preferiblemente en una forma de dosificación sólida o líquida.

30 **[0025]** Los extractos pueden administrarse solos o en combinación con adyuvantes que mejoran la estabilidad de los componentes extraídos, facilitan la administración de composiciones farmacéuticas que los contienen, proporcionan una mayor disolución o dispersión, apoyan la biodisponibilidad, proporcionan una terapia adjunta, y similares, incluyendo otros ingredientes activos. Ventajosamente, tales terapias de combinación utilizan dosis más bajas de los productos terapéuticos convencionales, evitando así la posible toxicidad y los efectos secundarios adversos provocados cuando esos agentes se utilizan como monoterapias.

35 **[0026]** Como se mencionó anteriormente, las formas de dosificación de los compuestos descritos en el presente documento incluyen vehículos y adyuvantes farmacéuticamente aceptables conocidos por los expertos en la técnica. Estos vehículos y adyuvantes incluyen, por ejemplo, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, sustancias reguladoras, agua, sales o electrolitos y sustancias basadas en celulosa. Además, la maltodextrina se puede usar para producir un extracto seco de flujo libre que es particularmente adecuado
40 para el procesamiento posterior en tabletas y cápsulas. Las formas de dosificación preferidas incluyen tabletas, cápsulas, comprimidos, líquido, solución, suspensión, emulsión, pastillas, jarabe, polvo reconstituible, gránulos, supositorios y parches transdérmicos. También se contemplan formas de dosificación de liberación controlada con o sin porciones de liberación inmediata. Se conocen métodos para preparar tales formas de dosificación (véase, por ejemplo, H. C. Ansel and N. G. Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5th ed., Lea and
45 Febiger (1990)). Los niveles y requisitos de dosificación son bien reconocidos en la técnica y pueden ser seleccionados por los expertos en la técnica a partir de los métodos y técnicas disponibles adecuados para un paciente particular. En realizaciones preferidas, la cantidad de extracto de valeriana administrada contiene 0,2-0,5 mg/kg de peso corporal VA, mientras que el contenido de AVA debe mantenerse lo más pequeño posible. Aunque una dosis por día puede ser suficiente, se pueden administrar hasta 5 dosis por día. Para dosis orales, se pueden requerir hasta 200 mg/día.
50 Como apreciará el experto en la materia, pueden requerirse dosis más bajas o más altas dependiendo de factores particulares. Por ejemplo, las dosis específicas y los regímenes de tratamiento dependerán de factores como el perfil de salud general del paciente, la gravedad y el curso del trastorno o la disposición del paciente, y el criterio del médico tratante, que incluye potenciales de interacción con otros medicamentos necesarios.

55 **[0027]** Por ejemplo, los extractos de la presente invención pueden administrarse de la misma manera que otros extractos de valeriana y composiciones farmacéuticas de los mismos. Preferiblemente, se administran por vía oral, más preferiblemente como formas de dosificación sólidas o líquidas.

[0028] A continuación, la presente invención se ilustra por medio de ejemplos que se refieren a realizaciones preferidas de la invención.

Figuras

[0029]

5 Las Figs. 1a, b y c son gráficos de columnas que muestran los resultados de la prueba de laberinto más elevada para las sustancias de referencia (Fig. 1a, gráfico superior) y los dos extractos de valeriana (VE 1, Fig. 1b, gráfico medio; y VE 2, Fig. 1c, gráfico inferior). En la coordenada y se representa el tiempo en % que los animales pasan en el brazo abierto. La Fig. 1a muestra los valores en % de las sustancias de referencia diazepam (DZP) e imipramina (IMI) en comparación con NaCl (solución salina 0.9) como control. La Fig. 1b presenta los resultados en % obtenidos para VE 1 y la Fig. 1c presenta los resultados en % para VE 2. Los valores numéricos indicados para VE 1 y 2 en las Figs. 1b y 1c, respectivamente, se refieren a la suma de los ácidos valerénicos VA y AVA administrados por kg de peso corporal.

15 Las Figs. 2a, b y c son gráficos de columnas que muestran los resultados de la prueba de suspensión de cola para las sustancias de referencia (Fig. 2a, gráfico superior) y ambos extractos de valeriana (VE 1, Fig. 2b, gráfico medio; y VE 2, Fig. 2c, gráfico inferior). En la coordenada y se representa el tiempo de la inmovilidad. La figura 2a muestra los valores de tiempo para las sustancias de referencia diazepam (DZP) e imipramina (IMI) en comparación con NaCl como control. La Fig. 2b presenta los resultados obtenidos para VE 1 y la Fig. 2c muestra los datos para VE 2. Los valores numéricos indicados para VE 1 y 2, respectivamente, se refieren a la suma de los ácidos valerénicos VA y AVA administrados por kg de peso corporal.

20 Las Figs. 3a, b y c son gráficos de columnas que muestran los resultados de la medición de la temperatura corporal interna para las sustancias de referencia (Fig. 2a, gráfico superior) y los dos extractos de valeriana (VE 1, Fig. 3b, gráfico del medio; y VE 2, Fig. 3c, gráfico inferior). En la coordenada y se representan las temperaturas del cuerpo del núcleo. La Fig. 3a presenta los valores de temperatura para las sustancias de referencia diazepam (DZP) e imipramina (IMI) en comparación con NaCl como control. La Fig. 3b presenta los resultados obtenidos para VE 1 y la Fig. 3c muestra los datos para VE 2. Los valores numéricos indicados para VE 1 y 2, respectivamente, se refieren a la suma de los ácidos valerénicos VA y AVA administrados por kg de peso corporal.

25 Las Figs. 4a, b, c y d son gráficos de columnas que muestran los resultados de la prueba de verificación de laberinto en cruz elevado del ejemplo 5 para el extracto de valeriana 1 (VE 1). En la coordenada y se representa el tiempo en % que los animales pasan en el brazo abierto (gráficos superior e inferior en el lado izquierdo, 4a, 4c), así como el número de cambios de brazo durante el período de observación de 7 minutos (superior e inferior). Gráficos inferiores en el lado derecho, 4b, 4d). Se indica la cantidad de ácido acetoxivalerénico agregado a VE-1 (mg AVA), n es igual al número de animales utilizados.

Las Figs. 5a y b son gráficos de columnas que muestran la temperatura interna del cuerpo de los animales durante el experimento de verificación EPM 5 para los diferentes extractos de valeriana. Se indica la cantidad de ácido acetoxivalerénico agregado a VE-1 (mg AVA), n es igual al número de animales utilizados.

35 En las figuras, * indica una desviación significativa de $p < 0.05$ para la columna que sigue.

Ejemplos

Animales

40 **[0030]** Para los experimentos de comportamiento, se mantuvieron ratones CD-1 machos (Charles River, Sulzfeld, Alemania) bajo condiciones de laboratorio controladas con un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 (luces encendidas a las 06.00 am), temperatura $20 \pm 2^\circ \text{C}$ y humedad del aire entre 55 y 60 %. Los animales tenían acceso libre a pellas comerciales (ssniff R / M-H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Alemania) y agua del grifo. Los animales se alojaron en grupos de 10 en jaulas Macrolon III. Después de la llegada, los animales recibieron un período de 2 semanas para la habituación. Al comienzo de los experimentos, los ratones tenían 8 semanas de edad. El número de animales por grupo fue entre 12 y 18.

45 **[0031]** Para el experimento de unión se utilizaron ratas RjHan macho: WI (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Francia). Las ratas se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio controladas como se describió anteriormente. Los animales se alojaron en grupos de 5 en jaulas Macrolon IV.

[0032] El trabajo que se informa aquí se realizó de acuerdo con las regulaciones de la CE y la National Act on the Use of Experimental Animals (Alemania). El protocolo fue aprobado por el Saxony-Anhalt Committee on Animal Care.

50 Ejemplo 1 - Preparación y análisis de extractos de valeriana (VE)

[0033] Para probar el efecto de diferentes relaciones de VA:AVA en modelos *in vivo* relacionados con GABA_A se prepararon dos extractos de valeriana diferentes (VE 1 y VE 2) de la siguiente manera. Se usaron raíces y rizomas de valeriana de la cepa seleccionada, así como material de referencia estándar (European Pharmacopoeia, Supplement 5.7. Valerian dry hydroalcoholic extract (1898) de Polonia. La cepa seleccionada se seleccionó a partir de las cepas

- que se presentan de forma natural en el campo, mediante un análisis rutinario de la relación de VA:AVA. Se encontró que las cepas de valeriana naturales que presentan una relación de VA:AVA de más de 2:1 son más abundantes de lo que se esperaba originalmente. La especie seleccionada también se depositó en el Herbario (colección de hierbas) del Institute for Biology of the Martin-Luther-University en Halle, Alemania, con fines de publicación (número de depósito HAL 115562). La propagación posterior proporcionó la cantidad necesaria de material de partida. El material de partida se agitó con hidroalcohol, es decir, hidroetanol (70% V/V) en una relación de 1:5 a 45 ° C durante 3½ días y luego se separó por filtración con una presión de 2 bar. Las tinturas obtenidas se concentraron mediante un evaporador rotatorio. Las sondas de ambos extractos se analizaron mediante Cromatografía Líquida de Ultrarrendimiento (UPLC) (El método se basa en Ph Eur-Monography Valerian dry hydroalcoholic extract [6.8./1898]). El contenido exacto de VA y AVA, la suma de VA y AVA, así como la relación VA:AVA se enumeran en la tabla a continuación.

Tabla 1

Designación	Contenido de VA (mg/l)	Contenido de AVA (mg/l)	VA + AVA (mg/l)	Relación VA:AVA
Extracto de valeriana 1	1165.5	98.3	1263.7	1:0.084
Extracto de valeriana 2	199.5	308.8	508.3	1:1.548

- [0034]** El extracto de valeriana 1 tenía una relación VA:AVA de aproximadamente 12:1 y el extracto de valeriana 2 tenía una relación de aproximadamente 1:1.5. El contenido de HVA era demasiado bajo para medirlo cuantitativamente.

- [0035]** Se disolvieron los extractos de valeriana (VE1 y VE 2), diazepam (Faustan®, AWD pharma GmbH & Co KG, Dresden, Alemania) e imipramina (Sigma, Düsseldorf, Alemania) como sustancias de referencia en solución salina y se administraron por vía oral con una aguja de alimentación por sonda para ratón. Para el control se administró el disolvente (solución salina al 0,9%). El volumen de aplicación fue de 0,1 ml / 10 g de peso corporal.

- [0036]** El contenido individual y total de VA y AVA, así como la dosis administrada a los animales de experimentación se enumeran en la tabla a continuación.

Tabla 2

	[Extracto de valeriana 1]			[Extracto de valeriana 2]		
VA + AVA (mg)	VA	AVA	Dosis (ml) p.o.	VA	AVA	Dosis (ml) p.o.
0.1	0.0922	0.00776	0.16	0.03925	0.06075	0.20
0.5	0.4610	0.0388	0.40	0.19630	0.30380	0.98
1.0	0.9220	0.0776	0.79	0.39250	0.60750	1.97
2.0	1.8440	0.1522	1.58	0.78500	1.21500	3.93
VA: ácido valerénico; AVA: ácido acetoxivalerénico; HVA: ácido hidroxivalerénico [inferior al nivel de cuantificación]						

- 25 Ejemplo 2 - Prueba de laberinto en cruz elevado (EPM)

- [0037]** La ansiedad situacional se midió en la prueba de laberinto en cruz elevado. El laberinto estaba hecho de poli(cloruro de vinilo) negro y tenía dos brazos abiertos y dos brazos cerrados (50 x 10 x 40 cm) montados a 50 cm del suelo. El piso de los brazos era liso. El nivel de luz era de 30 lux. Se colocó un ratón en la plataforma central del aparato frente a un brazo cerrado. Se usó una cámara en el techo de la sala de pruebas para marcar y grabar el comportamiento de los animales desde una sala adyacente durante un período de 7 minutos. Se registró el número de entradas en los brazos abiertos, el tiempo dedicado a los brazos abiertos y el tiempo dedicado a los brazos cerrados. Para evaluar el efecto ansiolítico, se determinó el tiempo empleado en el brazo abierto, que se prolonga con sustancias ansiolíticas. Además, también se analizaron los cambios totales en los movimientos, que reflejan la

actividad locomotora. (Rodgers RJ. Animal models of anxiety: where next? Behav Pharmacol 1997; 8: 477-96). El laberinto fue limpiado después de cada prueba.

Ejemplo 3 - Prueba de suspensión de cola

- 5 **[0038]** El efecto similar a los antidepresivos del extracto de valeriana se midió utilizando el ensayo de suspensión de cola (L. Steru, R. Chermat, B. Thierry y P. Simon, The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. Psychopharmacology (Berl), 85 (1985), pp. 367-370). La prueba se llevó a cabo inmediatamente después de medir la ansiedad en el laberinto elevado. Los ratones se suspendieron por sus colas utilizando una cinta adhesiva colocada aproximadamente a 1 cm de la punta de la cola y colgada aproximadamente a 30 cm por encima de la mesa. Los animales se suspendieron durante 6 minutos, y la duración de la inmovilidad se anotó manualmente durante el ensayo. La inmovilidad se definió como la ausencia de movimientos de extremidades o cuerpos, con la excepción de los causados por la respiración, cuando los ratones colgaban pasivamente y completamente inmóviles. La inmovilidad medida desde el minuto 2 hasta el minuto 6 se usó para evaluar los efectos del fármaco.

Ejemplo 4 - Temperatura corporal interna (BCT)

- 15 **[0039]** Después de la prueba de suspensión de cola, la temperatura interna del cuerpo se midió con un termómetro digital (ama digit) fabricado por Amarell GmbH (Kreuzwertheim, Alemania). Para ello, la sonda lubricada (Ø 1 mm) se insertó suavemente 3 cm en el recto. La temperatura rectal permite diferenciar los resultados relacionados con las acciones nerviosas centrales de los extractos y los efectos de sobredosis (Haffner F.; Die pharmakologische Wertbestimmung des Baldrians. Münch med Wschr 7: 271-272 [1929]).

Ejemplo 5 - Prueba de verificación en laberinto en cruz elevado (EPM)

- 20 **[0040]** Para verificar los resultados de la prueba EPM del Ejemplo 2, que indica que la relación entre VA:AVA es importante para la actividad ansiolítica de VE, el extracto VE-1 con el alto contenido de VA y el bajo contenido de AVA (12:1) fue utilizado nuevamente para replicar la actividad ansiolítica de 0.5 mg de ácidos valerénicos. Luego se agregó AVA (HWI Analytik GmbH, Rülzheim, Alemania) al extracto para cambiar las relaciones de VA:AVA de 12:1 (VE-1), a 1:0.5, 1:1 y 1:1.5 (VE 1-A; VE 1-B; VE 1-C), respectivamente. La cantidad de extracto se adaptó de tal manera que la suma de los VA, es decir, VA más AVA, fuera siempre la misma. En la tabla 3 a continuación se dan las diferentes cantidades de extracto con respecto a sus relaciones VA:AVA.

Tabla 3a - VA y AVA en diferentes composiciones de VE y la cantidad calculada para administración oral

	VA:AVA	VA mg/ml	AVA mg/ml	Base AVA + suministro AVA (mg/ml)		VA + AVA total (mg/ml)
VE -1	12:1	1.165	0.0983			1.2633
VE 1A	1:0.5	1.165	0.583	0.0983	0.48	1.748
VE 1B	1:1	1.165	1.165	0.0983	1.07	2.33
VE 1C	1:1.5	1.165	1.75	0.0983	1.65	2.915

Tabla 3b

	VA total + AVA (mg/ml)	0.5 mg/kg	2.0 mg/kg
VE - 1	0.4998	0.400 ml	1.580 ml
VE 1-A	1.748	0.286 ml	1.144 ml
VE 1-B	2.33	0.215 ml	0.858 ml
VE 1-C	2.915	0.172 ml	0.686 ml

[0041] Las VE (0,5 y 2,0 mg/kg, con respecto a la suma total de VA y AVA) se administraron por vía oral utilizando una aguja de alimentación por sonda para ratón (calibre 24, FST, Heidelberg, Alemania). Como control se administró una solución salina al 0,9%. El volumen dado fue de 0,1 ml /10 g de peso corporal. Después de la EPM, la temperatura interna del cuerpo (BCT) se midió con un termómetro digital (ama digit) fabricado por Amarell GmbH (Kreuzwertheim, Alemania). Para ello, la sonda lubricada ($\varnothing$ 1 mm) se insertó suavemente 3 cm en el recto.

Ejemplo 6 - Verificación de la temperatura del cuerpo (BCT)

[0042] El BCT para los animales que participan en la prueba EPM del ejemplo 5 se mantuvo para todos los grupos experimentales en el rango de control (Figura 4), incluso si los valores para los grupos que habían recibido 2 mg/kg fueron algo diferentes (0,5 mg/kg de extracto $F_{4,82} = 0.725$, $p = 0.725$; 2,0 mg/kg de extracto $F_{4,78} = 2.48$, $p = 0.051$). En algunos animales, la BCT se redujo a menos de 34°C (0,5 mg/kg = 1; 2,0 mg/kg = 3). Los resultados de estos animales fueron ignorados para la evaluación de los datos.

Ejemplo 7 - Ensayo de unión

[0043] ^3H -GABA (SA - 1,43 TBq/mmol) y ^3H -flunitrazepam (SA - 1,85 TBq/mmol) se obtuvo de PerkinElmer (Boston, EE. UU.), diazepam y clordiazepóxido, de AWD.pharma GmbH (Dresden, Alemania). Las VE probadas fueron idénticas a los extractos VE-1 y VE-2 utilizados en los otros ejemplos.

[0044] Para el ensayo de unión de ^3H -GABA el tejido (córtex frontal de rata diseccionado) se homogeneizó en un regulador Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 120 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 2 mM y de MgCl_2 1 mM; para ^3H -flunitrazepam se homogeneizó en regulador Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, que contenía EGTA 1 mM, EDTA 10 mM y MgCl_2 3 mM, se centrifugó (50000 g, 15 min) y se lavó dos veces con el regulador correspondiente. El sedimento resultante se resuspendió con regulador. Se incubaron partes alícuotas de la suspensión de membrana cruda (50 μg de proteína) durante 45 min a 37°C con ^3H -GABA 2.5 nM o ^3H -flunitrazepam 1 nM a $0-4^{\circ}\text{C}$ durante 60 min. La unión específica se calculó restando la unión no específica, definida como la que se observa en presencia de GABA 1 μM no marcado o diazepam o clordiazepóxido 1 μM , de la unión total obtenida con radioligando solo. En paralelo, se utilizaron VE-1, VE-2 y AVA para todos los ensayos de unión. La incubación se terminó mediante la adición de un regulador enfriado con hielo y una filtración rápida a través de filtros de fibra de vidrio. Los filtros se lavaron, se secaron, se añadió un cóctel de centelleo y se hizo un recuento de la radioactividad utilizando un contador β (Beckman Coulter, Alemania). Los valores CE_{50} se determinaron mediante la adición de fármacos no marcados (GABA, clordiazepóxido, diazepam, AVA, VE-1 y VE-2) en un amplio rango de concentración (10^{-10} a 10^{-4} M).

[0045] La evaluación estadística de los datos obtenidos en el laberinto en cruz elevado se llevó a cabo utilizando la prueba H de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. La temperatura corporal interna se analizó utilizando ANOVA. El umbral de significación se estableció en $p < 0,05$.

[0046] Los dos extractos de valeriana probados no se unieron a los receptores de benzodiazepinas en las membranas sinaptosómicas del córtex frontal de la rata, mientras que el diazepam y el clordiazepóxido sí lo hicieron (Tabla 4). En contraste, ambas VE se unen a los receptores GABA, por lo que la afinidad de unión se expresó más con VE-1 en comparación con VE-2 (Tabla 5).

Tabla 4

Valores CE_{50} de competencia de diazepam, clordiazepóxido, VE-1 y VE-2 en sitios de unión marcados con ^3H -flunitrazepam de membranas sinaptosómicas crudas del córtex frontal de rata				
	Diazepam	Clordiazepóxido	VE-1	VE-2
CE_{50} (μM)	0.40 ± 0.05	0.64 ± 0.08	> 50	> 50

Tabla 5

Valores CE_{50} de competencia de GABA, AVA, VE-1 y VE-2 en sitios de unión marcados ^3H -GABA de membranas sinaptosómicas crudas del córtex frontal de rata (los valores para las VE se refieren a VA en los extractos)				
	GABA	AVA	VE-1	VE-2
CE_{50} (μM)	1.82 ± 0.21	-	5.61 ± 1.68	10.04 ± 1.34

[0047] Todas las pruebas de comportamiento se realizaron en el período de luz entre las 8:00 a.m. y las 2:00 p.m. Los animales fueron ordenados al azar para su prueba.

Resumen sobre los experimentos 1 a 4

- 5 **[0048]** Los experimentos *in vivo* anteriores demuestran que la relación de VA a AVA es un parámetro importante para extractos de valeriana activos en GABA_A. Aunque el contenido total de VA y AVA fue el mismo para los dos extractos de valeriana utilizados en los experimentos anteriores, solo el extracto de valeriana 1, que tenía un contenido de VA significativamente mayor que el del extracto de valeriana 2, demostró efectos ansiolíticos. Además, un mayor contenido en VA comparado con AVA no solo es más efectivo, sino que también permite reducir la dosis y, por lo tanto, evitar o reducir la intoxicación relacionada con la valeriana. Por lo tanto, los extractos de valeriana de la presente invención son más efectivos y seguros al mismo tiempo.

Resumen sobre los experimentos 5 a 7

- 15 **[0049]** Para los grupos de animales en la prueba de verificación de EPM tratados con 0,5 mg/kg de extracto + AVA se encontró un efecto significativo ($X^2_{4,87} = 24.37$, $p < 0.001$). Los animales de control (tratados con solución salina) pasaron 15.15 ± 1.76 % de tiempo en el brazo abierto. Los animales que habían recibido VE-1 (cantidad total de VA de 0.5 mg/kg; VA:AVA = 12:1) mostraron tiempos extendidos en el brazo abierto (20.16 ± 1.24 %; $U_{2, 18, 17} = 89.0$, $p = 0.035$). Esto debe interpretarse como un efecto ansiolítico (figura 4). Los resultados de los otros grupos de animales, que habían recibido VE con diferentes proporciones de ácidos valerénicos (VA:AVA = 1: 0.5 o 1: 1.5) estaban en el rango del grupo de control de solución salina o demostraron el efecto opuesto, es decir, una acción ansiogénica (VA:AVA = 1: 1; $U_{2, 18, 18} = 79.5$, $p = 0.008$).

- 20 **[0050]** Los grupos tratados con 2.0 mg/kg de extracto + AVA también difirieron significativamente ($X^2_{4,86} = 11.05$, $p = 0.026$). El VE -1 en una cantidad elevada (cantidad total de AV de 2,0 mg/kg; AV: AVA = 12:1) indujo más bien una actividad ansiogénica (9.61 ± 2.02 %, $U_{2, 18, 17} = 93.0$, $p = 0.049$). Se obtuvo un resultado similar con VE -1 A (VA:AVA = 1: 0.5) (9.06 ± 1.64 %, $U_{2, 18, 17} = 86.0$, $p = 0.027$) mientras que los resultados para las otras dos VE se mantuvieron en el rango similar para la solución salina.

- 25 **[0051]** La actividad locomotora (cambios totales en brazo) fue similar en todos los grupos experimentales (0,5 mg/kg de extracto $X^2 = 4.89$, $p = 0.298$; 2.0 mg/kg de extracto $X^2 = 6.27$, $p = 0.18$, Fig. 4).

- 30 **[0052]** El BCT permaneció en el rango de control para todos los grupos experimentales (Figura 5), incluso si los valores para los grupos que habían recibido 2 mg/kg eran algo diferentes (0,5 mg/kg de extracto $F = 0.725$, $p = 0.725$; 2,0 mg/kg de extracto $F = 2.48$, $p = 0.051$). En algunos animales, la BCT se redujo a menos de 34°C (0,5 mg/kg = 1; 2,0 mg/kg = 3). Los resultados de estos animales fueron descartados para la evaluación de los datos.

[0053] Los dos extractos de valeriana probados no se unieron a los receptores de benzodiazepina en las membranas sinaptosómicas del córtex frontal de la rata, mientras que el diazepam y el clordiazepóxido sí lo hacen. En contraste, ambos VE se unen a los receptores GABA, por lo que la afinidad de unión se expresó más con VE-1 en comparación con VE-2.

REIVINDICACIONES

1. Extracto de valeriana para uso en el tratamiento y profilaxis de trastornos relacionados con GABA_A seleccionados del grupo que consiste en ansiedad, depresión, inquietud e insomnio, en donde la relación de ácido valerénico (VA) a ácido acetoxivalerénico (AVA) en el extracto es de al menos 2:1 en peso.
2. El extracto para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la relación de ácido valerénico (VA) a ácido acetoxivalerénico (AVA) en el extracto es al menos 3:1, preferiblemente al menos 4:1, más preferiblemente al menos 10:1, muy probablemente al menos aproximadamente 12:1 en peso.
3. El extracto para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el disolvente para producir el extracto se selecciona del grupo que consiste en éter de petróleo, acetato de etilo y/o alcoholes acuosos (hidroalcoholes), preferiblemente hidroalcoholes con un contenido de alcohol entre 40-80%, (v/v) más preferiblemente metanol o etanol acuoso, siendo lo más preferible etanol acuoso.
4. Composición farmacéutica que comprende un extracto de valeriana, en donde la relación de ácido valerénico (VA) a ácido acetoxivalerénico (AVA) en el extracto es de al menos 2:1 en peso.
5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la relación de ácido valerénico (VA) a ácido acetoxivalerénico (AVA) en el extracto es al menos 3:1, preferiblemente al menos 4:1, más preferiblemente al menos 10:1, siendo lo más probable al menos aproximadamente 12:1 en peso.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde el disolvente para producir el extracto se selecciona del grupo que consiste en éter de petróleo, acetato de etilo y/o alcoholes acuosos (hidroalcoholes), preferiblemente hidroalcoholes con un contenido de alcohol entre 40-80%, (v/v), más preferiblemente metanol o etanol acuoso, siendo lo más preferible etanol acuoso.
7. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende además al menos un extracto seleccionado del grupo de extractos producidos a partir de toronjil [melisa], lúpulo y flor de la pasión, que comprende además preferiblemente extractos producidos a partir de toronjil [melisa], lúpulo y flor de la pasión.
8. Método para preparar un extracto de valeriana que comprende los pasos de:
 - a) seleccionar raíces y/o rizomas de valeriana, en donde la relación de ácido valerénico (VA) a ácido acetoxivalerénico (AVA) es de al menos 2:1 en peso,
 - b) extraer el ácido valerénico (VA) y el ácido acetoxivalerénico (AVA) de las raíces y/o los rizomas utilizando un disolvente adecuado,
 - c) opcionalmente, procesar adicionalmente el extracto crudo para que sea adecuado para la administración humana.
9. Método para preparar un extracto de valeriana que comprende los pasos de:
 - a) proporcionar raíces y/o rizomas de valeriana,
 - b) extraer el ácido valerénico (VA) y el ácido acetoxivalerénico (AVA) de las raíces y/o los rizomas utilizando un disolvente adecuado,
 - c) adaptar el contenido de ácido valerénico (VA) y ácido acetoxivalerénico (AVA) en el extracto de manera que la relación de ácido valerénico (VA) a ácido acetoxivalerénico (AVA) sea al menos 2:1 en peso,
 - d) opcionalmente, procesar adicionalmente el extracto para que sea adecuado para la administración humana.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde el contenido de ácido valerénico (VA) y ácido acetoxivalerénico (AVA) en el extracto se adapta de modo que la relación de ácido valerénico (VA) a ácido acetoxivalerénico (AVA) sea al menos 3:1, preferiblemente al menos 4:1, más preferiblemente al menos 10:1, siendo lo más probable al menos aproximadamente 12:1 en peso.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 8 o 10, en donde el disolvente para producir el extracto se selecciona del grupo que consiste en éter de petróleo, acetato de etilo y/o alcoholes acuosos (hidroalcoholes), preferiblemente hidroalcoholes con un contenido de alcohol entre 40 y 80 %, (v/v), más preferiblemente metanol o etanol acuoso, siendo lo más preferible etanol acuoso.

Fig. 1a

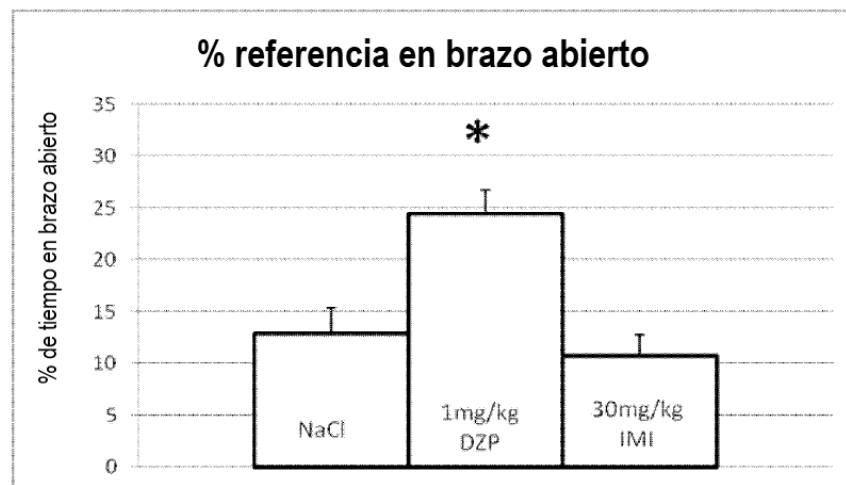


Fig. 1b

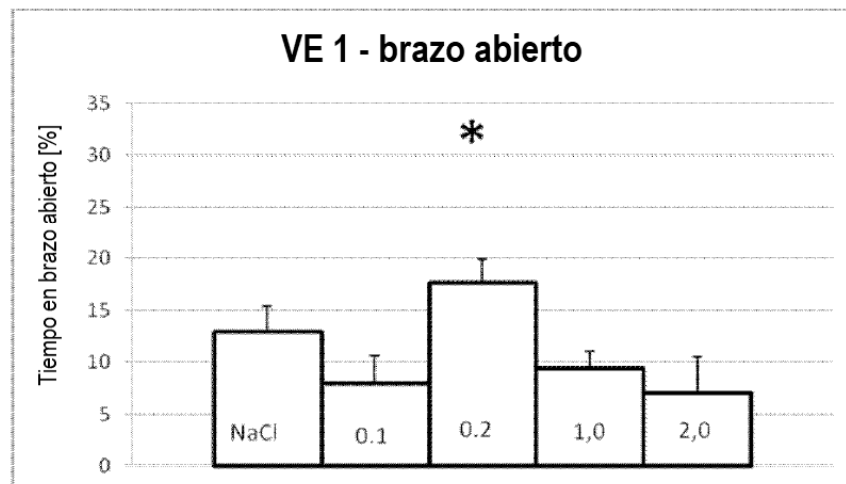


Fig. 1c

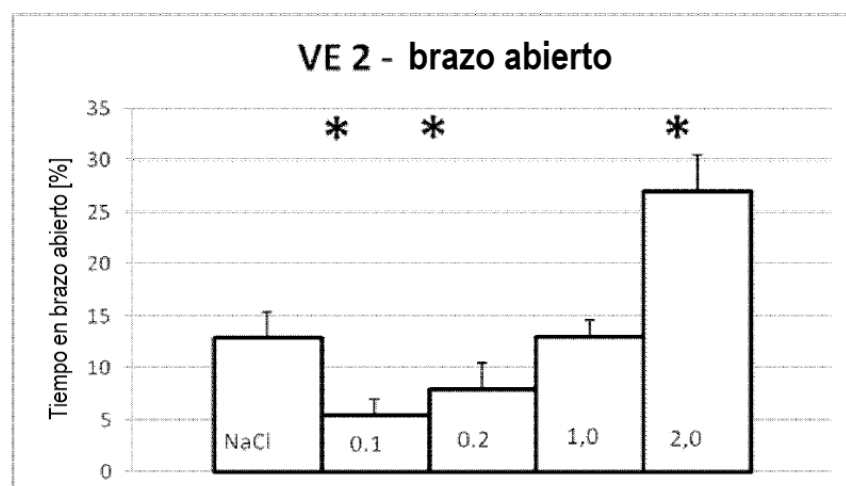


Fig. 2a

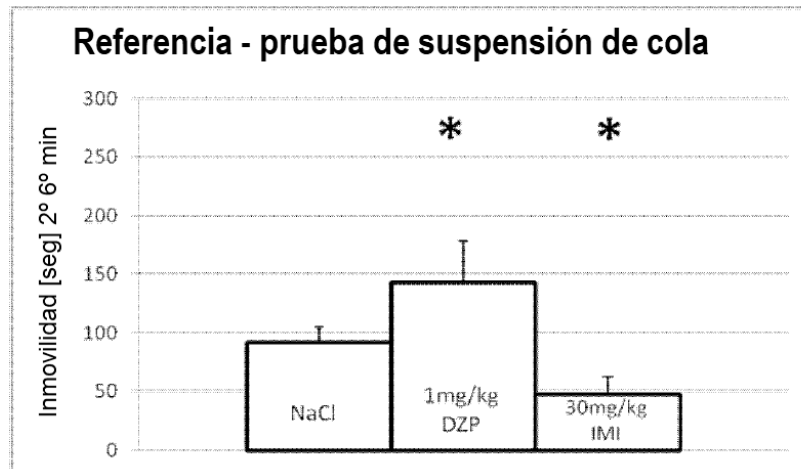


Fig. 2b

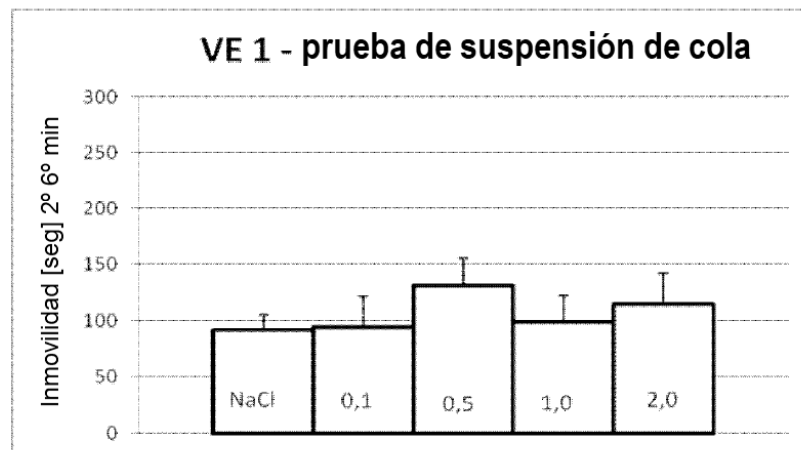


Fig. 2c

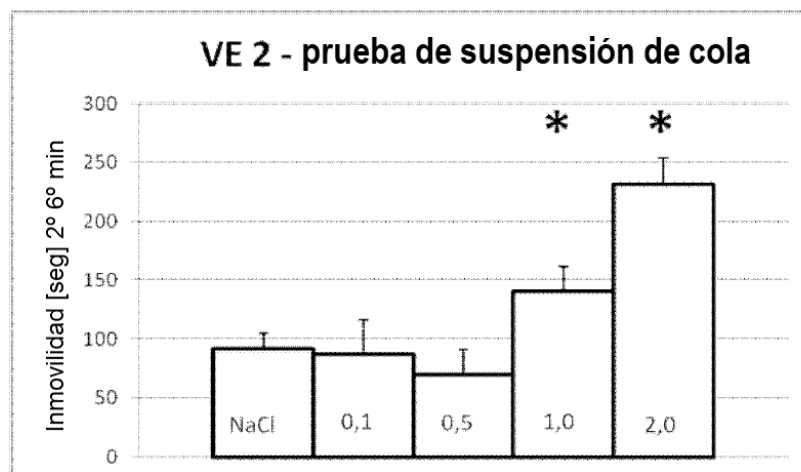


Fig. 3a

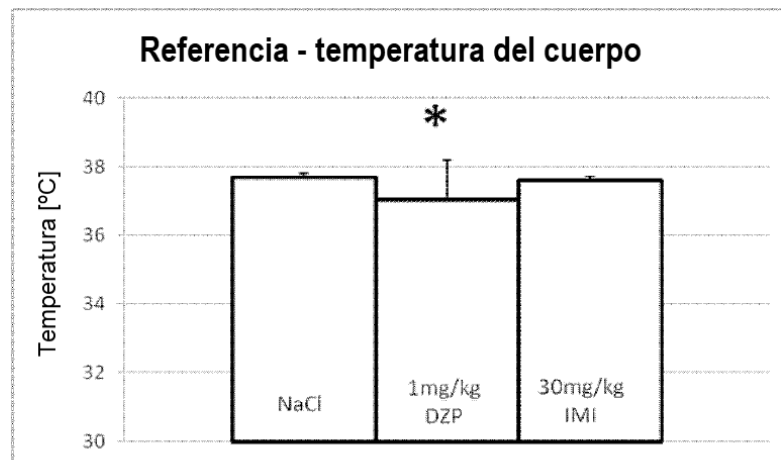


Fig. 3b

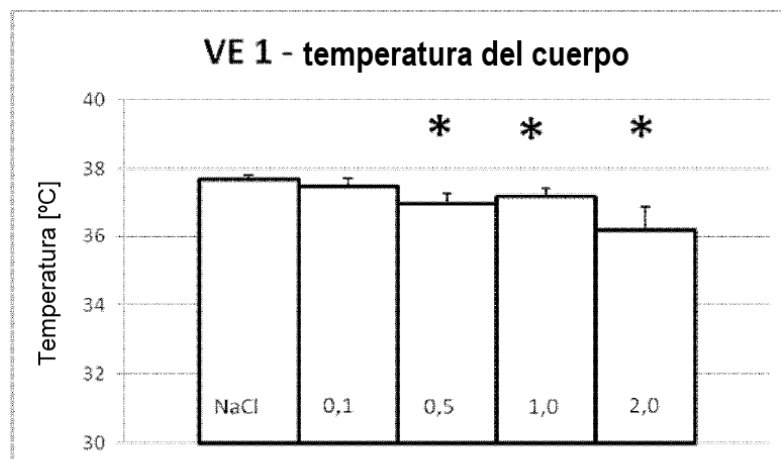


Fig. 3c

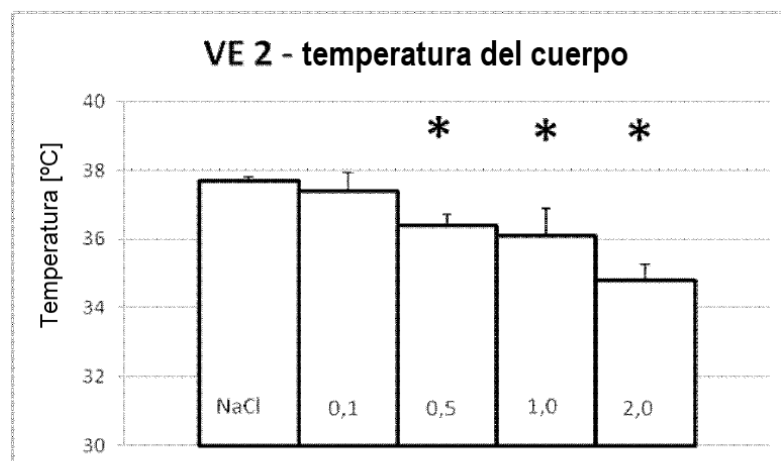


Fig. 4a

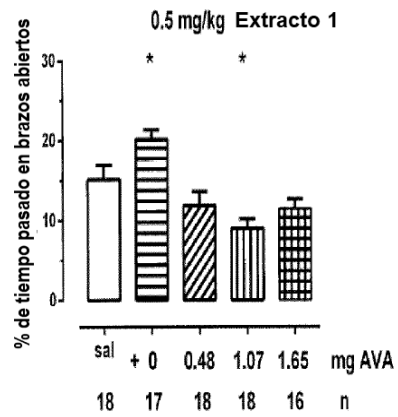


Fig. 4b

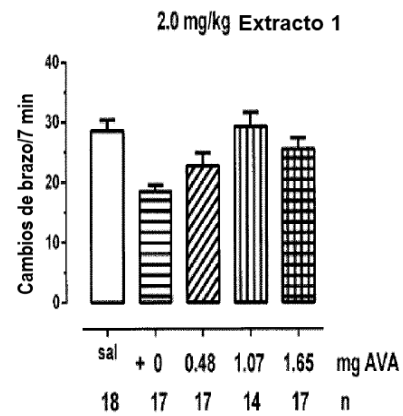
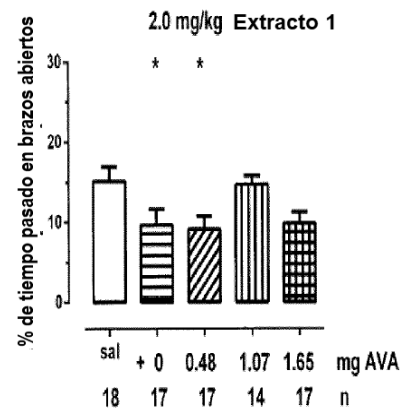
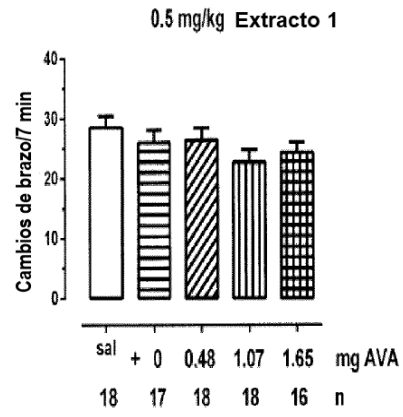


Fig. 4c

Fig. 4d

Fig. 5a

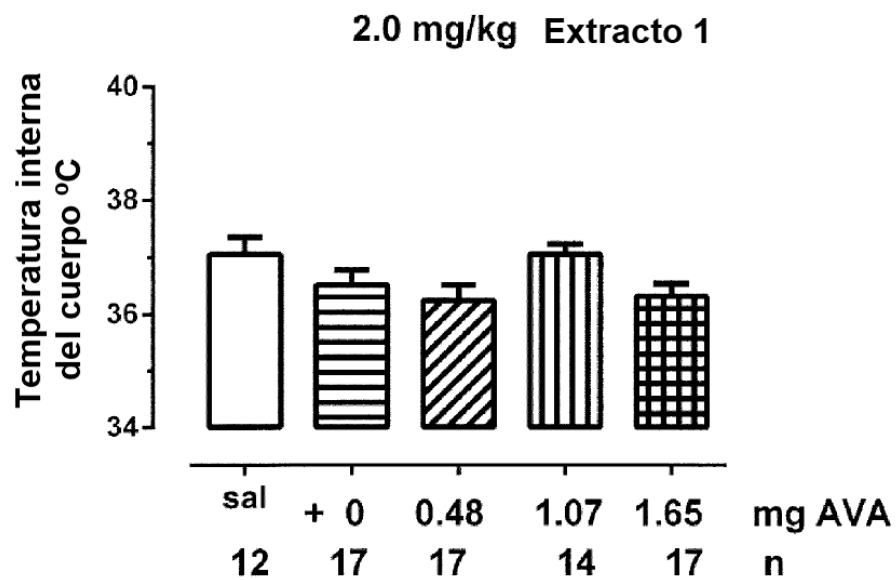
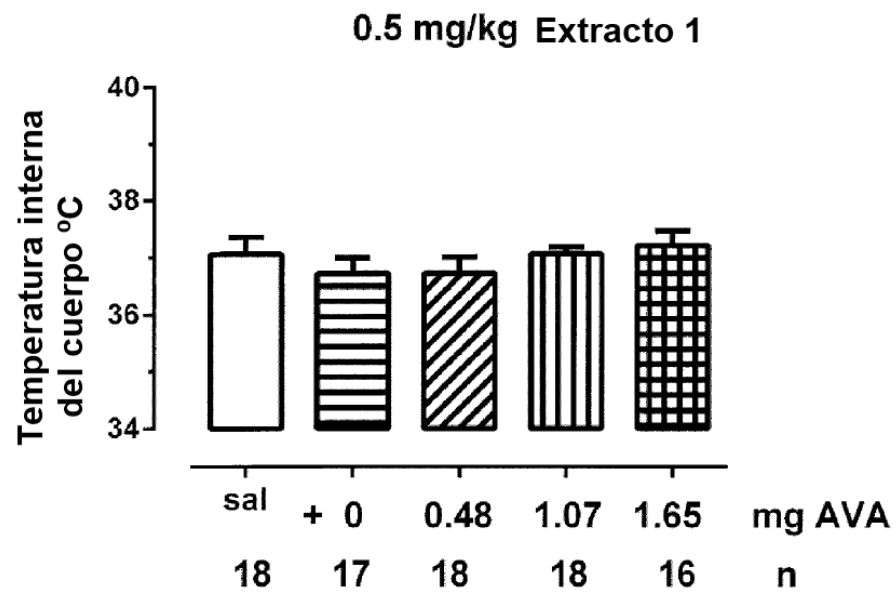


Fig. 5b