



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 895**

51 Int. Cl.:
A61K 36/71 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02723408 .7**
96 Fecha de presentación : **12.03.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1372684**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54 Título: **Métodos para reducir polipéptidos de β -amiloide.**

30 Prioridad: **12.03.2001 US 804420**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.11.2011

73 Titular/es: **Mayo Foundation for Medical Education
and Research
200 First Street S.W
Rochester, Minnesota 55905, US**

72 Inventor/es: **Eckman, Christopher B. ;
Yager, Debra, M. ;
Haugabook, Sharie, J. y
Fauq, Abdul, H.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 367 895 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

Métodos para reducir polipéptidos de beta-amiloide

CAMPO TÉCNICO

5 Esta invención se refiere a polipéptidos de β -amiloide ($A\beta$), y más particularmente a métodos para reducir polipéptidos de $A\beta$ usando un extracto, o una fracción activa del mismo, de *Cimicifuga*.

ANTECEDENTES

10 Los pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD) típicamente son presentados a un médico por un pariente que ha observado una decadencia en la memoria con o sin un cambio en otras capacidades cognitivas tales como decadencias en la función ejecutiva, dificultad para encontrar las palabras o deterioro visuoespacial tal como una incapacidad para dibujar estructuras geométricas complejas o perderse en lugares familiares. El análisis neuropatológico de cerebros de pacientes con AD ha revelado una pérdida neuronal y sináptica intensiva en regiones cerebrales seleccionadas, nudos neurofibrilares y la deposición de polipéptidos de β -amiloide ($A\beta$) en forma de placas seniles en todo el hipocampo y el neocórtex.

15 Los polipéptidos de $A\beta$ se producen a partir de la proteína precursora de amiloide (APP) a través de las acciones proteolíticas combinadas de β - y γ -secretasas y se secretan a continuación al medio extracelular. Los estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos han revelado que los polipéptidos de $A\beta$ depositados en cerebros de pacientes con AD tienen una heterogeneidad amino- y carboxilo-terminal sustancial y pueden contener de 39 a 43 residuos de aminoácido, siendo el β -amiloide 1-40 ($A\beta_{40}$) y 1-42 ($A\beta_{42}$) los más predominantes. Al comparar las señales obtenidas usando anticuerpos dirigidos al extremo amino de $A\beta$ con las obtenidas al capturar el péptido de un epítipo interno, se encontró que virtualmente todo el $A\beta_{42}$ en un cerebro con AD está modificado y/o truncado aminoterminalmente.

SUMARIO

25 La invención presenta métodos para reducir el nivel de un polipéptido de $A\beta$ usando un extracto de *Cimicifuga*. La invención también presenta métodos para producir una fracción activa de un extracto de *Cimicifuga*. Una fracción activa es una que es capaz de reducir el nivel de un polipéptido de $A\beta$ en o secretado de una célula (in vitro o in vivo).

30 En un aspecto, la invención proporciona métodos para reducir el nivel de un polipéptido de β -amiloide ($A\beta$) en o secretado de una célula in vitro. Los métodos incluyen poner en contacto la célula con una cantidad de un extracto de *Cimicifuga* o de una fracción activa del mismo en una cantidad que sea eficaz para reducir el nivel del polipéptido de $A\beta$ y verificar el nivel del polipéptido de $A\beta$ en o secretado de la célula. Células representativas incluyen células H4, células M17, células 293, células de ovario de hámster chino (CHO), fibroblastos primarios, C6, cultivos neuronales primarios, cultivos cerebrales mixtos primarios, Daoy, SK-N-SH, SK-N-AS y SK-N-FI.

35 En otro aspecto de la invención, se proporciona un extracto de *Cimicifuga* o una fracción activa del mismo para el uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer en un mamífero. La invención también proporciona el uso de un extracto de *Cimicifuga* o una fracción activa del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer. Estos aspectos de la invención se refieren al uso de un extracto de *Cimicifuga* o un fragmento activo del mismo para tratar a un mamífero que tiene AD o con riesgo de desarrollar AD. En estos aspectos de la invención, una cantidad de extracto de *Cimicifuga* o una fracción activa del mismo se administra al mamífero en una cantidad que es eficaz para tratar o prevenir la AD. Generalmente, el extracto o la fracción activa del mismo se administra a un mamífero oralmente, intravenosamente, intracranalmente, intracerebralmente, subcutáneamente, intramuscularmente, intranasalmente o intraperitonealmente. Un mamífero representativo es un roedor, por ejemplo, un ratón. En una realización, el ratón expresa una APP que tiene una mutación sueca. Un ejemplo de tal ratón es un ratón Tg2576. El extracto de *Cimicifuga* o la fracción activa del mismo puede ser de *C. racemosa*, y además puede obtenerse a partir de la raíz o el rizoma de una planta de *C. racemosa*. El extracto de *C. racemosa* es generalmente un extracto etanólico o acuoso. Un componente activo dentro de una fracción activa puede ser soluble en un disolvente tal como dicloruro de metileno, acetato de etilo y n-butanol, y los componentes activos solubles en tales disolventes son típicamente lipófilos. Un componente activo dentro de una fracción activa que sea capaz de reducir el nivel de un polipéptido de $A\beta$ puede tener un peso molecular de menos de 10 kD.

50 Una reducción en el nivel de un polipéptido de $A\beta$ puede deberse a una producción disminuida del polipéptido de $A\beta$ o un catabolismo incrementado del polipéptido de $A\beta$. En una realización de la invención, el nivel del polipéptido de $A\beta$ se reduce en al menos 10%, al menos 25%, al menos 50% o al menos 80% en comparación con el nivel del polipéptido de $A\beta$ en o secretado de una célula correspondiente que no está en contacto con el extracto o la fracción

activa del mismo. Una reducción en el nivel de un polipéptido de A β puede ser una reducción en el nivel de A β 40 o A β 42. Adicionalmente, la reducción en el nivel de un polipéptido de A β puede ser una reducción preferente en el nivel de A β 42. Además, el extracto o la fracción activa del mismo típicamente no debe tener un efecto significativo sobre el nivel de uno o más de APP, CTF α , CTF β o sAPP α .

5 En otro aspecto más de la invención, se proporcionan métodos para producir una fracción activa de un extracto de *Cimicifuga* que reduce el nivel de un polipéptido de A β durante el contacto con una célula. Los métodos incluyen obtener un extracto de material vegetal de *Cimicifuga*, fraccionar por tamaños el extracto a través de un filtro para obtener una fracción activa, y probar la fracción activa para confirmar que la fracción activa reduce el nivel de un polipéptido de A β . En este aspecto de la invención, una fracción activa contiene componentes activos que tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 10 kD.

10 La invención también proporciona métodos para producir una fracción activa de un extracto de *Cimicifuga* que reduce el nivel de un polipéptido de A β durante el contacto con una célula, que incluyen obtener un extracto de material vegetal de *Cimicifuga*, extraer el extracto de *Cimicifuga* con hexano (produciendo de ese modo una fracción soluble en hexano y una fracción insoluble en hexano) y probar la fracción insoluble en hexano para confirmar que la fracción insoluble en hexano reduce el nivel del polipéptido de A β . Un hexano representativo es el n-hexano. Tales métodos pueden incluir adicionalmente extraer la fracción insoluble en hexano con un dicloroalcano (produciendo una fracción soluble en dicloroalcano y una fracción insoluble en dicloroalcano) donde la fracción soluble en dicloroalcano típicamente reduce el nivel del polipéptido de A β durante el contacto con una célula. Un dicloroalcano representativo es el dicloruro de metileno. Métodos para producir una fracción activa también pueden incluir extraer la fracción soluble en dicloroalcano con un acetato de alquilo (produciendo una fracción soluble en acetato de alquilo y una fracción insoluble en acetato de alquilo), donde la fracción soluble en acetato de alquilo reduce típicamente el nivel de un polipéptido de A β . Un acetato de alquilo representativo es el acetato de etilo. Además, los métodos de la invención pueden incluir extraer la fracción soluble en acetato de alquilo con un alcohol (produciendo una fracción soluble en alcohol y una fracción insoluble en alcohol) en donde la fracción soluble en alcohol típicamente reduce el nivel del polipéptido de A β . Un alcohol representativo es el n-butanol. El producto de cualquiera de las extracciones lo fraccionaciones descritas anteriormente puede concentrarse adicionalmente, por ejemplo, mediante liofilización.

También se describe en la presente memoria una composición que contiene una fracción activa de un extracto de *Cimicifuga* y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal fracción activa puede reducir el nivel de un polipéptido de A β durante el contacto con una célula que produce el polipéptido de A β .

30 También se describe en la presente memoria un artículo de fabricación que contiene una fracción activa de un extracto de *Cimicifuga*, un portador farmacéuticamente aceptable y material de envasado. Generalmente, el material de envasado contiene una etiqueta o un prospecto que indica que la composición es eficaz para reducir el nivel de un polipéptido de A β .

35 A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que es conocido comúnmente para un experto normal en la especialidad a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o la prueba de la presente invención, métodos y materiales adecuados se describen posteriormente. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitativos. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

40 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se indican en los dibujos adjuntos y la descripción posterior. Otras características, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de los dibujos y la descripción detallada, y de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 La invención proporciona métodos para reducir el nivel de un polipéptido de A β en o secretado de una célula in vitro. Los métodos de la invención incluyen poner en contacto una célula con un extracto de *Cimicifuga* o una fracción activa del mismo en una cantidad eficaz de modo que el A β se reduzca, y subsiguientemente verificar el nivel de A β .

50 La medicina china tradicional ha empleado desde hace mucho tiempo especies de *Cimicifuga* para el tratamiento de calambres menstruales, fatiga, ansiedad, artritis reumatoide, alivio de la fiebre, el dolor, la inflamación, la sedación, la hinchazón de las articulaciones, la congestión respiratoria por resfriados y la presión sanguínea elevada. Hace más de dos siglos, los americanos nativos usaban la raíz de *Cimicifuga racemosa*, también conocida como cohosh negro, raíz de corredora negra, hierba de la chinche, cimicífuga y raíz de las pieles rojas, para aliviar muchos síntomas asociados con la menstruación y la menopausia, incluyendo calambres, sofocos, cefaleas, irritabilidad, sudores, así como muchos de los síntomas no relacionados con la menstruación analizados anteriormente. *Cimicifuga*, una planta perenne de los bosques nativos, incluye varias especies comúnmente conocidas que se usan medicinalmente y/u ornamentalmente (p. ej., *C. simplex*, *C. dahurica*, *C. foetida*, *C. japonica*, *C. acerina* y *C.*

racemosa). Los extractos o las fracciones activas de *C. racemosa* son particularmente útiles en los métodos de la invención.

Extractos de Cimicifuga y reducción de los niveles de polipéptidos de A β

La invención presenta métodos para reducir el nivel de un polipéptido de A β en o secretado de una célula in vitro. Según se usa en la presente memoria, un polipéptido de A β se refiere a una porción de una APP (p. ej., APP humana) que se produce después de una segmentación por β -secretasa y γ -secretasa (por ejemplo, residuos 671-711 (A β 40) o 671-713 (A β 42) de N° de Registro del GenBank D87675). Un polipéptido de A β puede tener de 39 a 43 residuos de aminoácido (p. ej., 39, 40, 41, 42 o 43 residuos). Dada la heterogeneidad en la longitud de polipéptidos de A β , es una característica adicional de la invención que un extracto pueda reducir el nivel de un polipéptido de A β específico (p. ej., A β 40 o A β 42). La capacidad para distinguir una reducción en el nivel de, por ejemplo, A β 40 o A β 42 es significativa, puesto que se considera que A β 42 es más amiloidogénico. Por ejemplo, el análisis inmunocitoquímico ha mostrado inmunomarcaje para A β 42 en todos los tipos de placas seniles, escaso marcaje de placas usando anticuerpos específicos para el extremo A β 40, y detección de epítomos tanto de A β 40 como de A β 42 en amiloide cerebrovascular. Por otra parte, el análisis de mutaciones ligadas a la AD familiar (FAD) ha mostrado elevaciones en la acumulación de A β extracelular, particularmente A β 42. Según se describe en la presente memoria, la reducción de polipéptidos de A β mediante extractos de *Cimicifuga* puede ser preferente para A β 42. Según se usa en la presente memoria, "preferente" se refiere a una reducción significativa de un polipéptido de A β (p. ej., A β 42) en comparación con el nivel de uno o más polipéptidos de A β diferentes (p. ej., A β 40). "Significativo" se refiere a un cálculo estadístico de significación en el que un valor de p de menos de 0,05 (p. ej., un valor de p de menos de 0,025 o menos de 0,01) se obtiene usando un cálculo estadístico apropiado, p. ej., una prueba t apareada. Por lo tanto, un valor de p de más de 0,05 indica una falta de significación estadística basándose en tal cálculo.

Los métodos de la invención incluyen poner en contacto una célula (in vitro) con una cantidad eficaz de un extracto de *Cimicifuga* o una fracción activa del mismo y verificar el nivel de A β en o secretado de la célula. Una cantidad eficaz de un extracto o una fracción activa es una cantidad que reduce el nivel de un polipéptido de A β en o secretado de una célula en al menos 10% (p. ej., al menos 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%) o suprime completamente el nivel de un polipéptido de A β en comparación con el nivel del polipéptido de A β en o secretado de una célula correspondiente no tratada con el extracto o la fracción activa. Un componente en una fracción activa que reduce el nivel de un polipéptido de A β puede ejercer un efecto en cualquiera de un número de etapas a lo largo de la ruta de secreción de A β y, en el caso de la AD, deposición en el cerebro. El nivel de polipéptido de A β no solo depende de su producción, sino también en los mecanismos responsables de su retirada. Sin querer limitarse por un mecanismo particular, una reducción en el nivel de un polipéptido de A β puede deberse a la actividad de proteínas de unión que secuestran el polipéptido, o a otros mecanismos celulares tales como una producción disminuida o un catabolismo incrementado de un polipéptido de A β . A modo de ejemplo, el catabolismo de un polipéptido de A β implica probablemente proteasas tanto intracelulares (p. ej., que actúan en el sitio de generación del polipéptido de A β y/o dentro de la ruta secretora) como extracelulares (p. ej., superficie celular, secretadas, endosomales y/o lisosomales). Compuestos que reducen el nivel de uno o más polipéptidos de A β pueden ser útiles, por ejemplo, como compuestos terapéuticos o para diseñar compuestos terapéuticos.

Las células pueden ponerse en contacto in vitro con un extracto de *Cimicifuga* o una fracción activa del mismo mientras están en cultivo celular (p. ej., introduciendo un extracto en medio de cultivo). Células representativas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, células de neuroglioma H4, neuroblastoma M17, riñón humano 293, ovario de hámster chino (CHO), fibroblásticas primarias, C6, neuronales primarias, cerebrales mixtas primarias, Daoy, SK-NSH, SK-N-AS y SK-N-FI. Células adecuadas para el rastreo primario pueden obtenerse de la American Type Culture Collection (ATCC) (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110). Además, tales células pueden ser células transgénicas que tienen un constructo que contiene un ácido nucleico que codifica APP o cualquier porción de APP que contenga un fragmento de A β . Por ejemplo, las células H4 β APP695wt son células H4 que tienen una isoforma de APP silvestre humana de 696 aminoácidos. Isoformas de APP que se producen mediante reparación de mRNA alterna incluyen la APP695 mencionada anteriormente, así como APP751 y APP770. Además, las células pueden expresar APP humana que tiene una mutación que, por ejemplo, cambia una lisina-metionina en los residuos de aminoácido 670 y 671 por una asparagina-leucina (es decir, mutación sueca) o una que cambia una valina por una isoleucina en el residuo de aminoácido 717.

Un extracto de *Cimicifuga* o una fracción activa procedente del mismo también puede administrarse a un mamífero tal como un ser humano o un roedor para reducir el nivel de A β . Por ejemplo, un extracto de *Cimicifuga* puede administrarse a un individuo por encima de 60 años de edad o a un individuo diagnosticado de AD o que tiene riesgo de desarrollar AD (p. ej., basándose en la historia familiar o la presencia de una mutación asociada con AD). Un extracto de *Cimicifuga* también puede administrarse a un roedor tal como un cobaya o un ratón y, en particular, a un modelo animal de AD. Están disponibles modelos animales de AD que acumulan A β y que desarrollan placas de un modo dependiente de la edad. En particular, están disponibles ratones transgénicos que tienen una mutación en un gen de presenilina y/o expresan una APP que tiene una mutación (por ejemplo, una mutación sueca). Un ratón representativo que tiene una mutación sueca es Tg2576 (Holcomb et ál., 1998, Nat. Med., 4:97-100). El ratón Tg2576 acumula polipéptidos de A β y desarrolla placas de un modo dependiente de la edad. Un extracto de

Cimicifuga o una fracción activa del mismo puede administrarse a un mamífero mediante cualquier ruta, incluyendo oralmente, intravenosamente, intracranealmente, intracerebralmente, subcutáneamente, intramuscularmente, intranasalmente o intraperitonealmente.

5 Puesto que una reducción en el nivel de un polipéptido de A β in vitro o in vivo puede ser un resultado directo de una disminución en la viabilidad celular, típicamente se evalúan los efectos tóxicos de un extracto de *Cimicifuga* o una fracción activa del mismo sobre una célula o un mamífero. Métodos para evaluar la toxicidad celular son conocidos para los expertos en la especialidad. Por ejemplo, el grado de conversión de una sal de tetrazolio (p. ej., MTS) en formazano es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas sobre una placa de cultivo celular. La conversión de MTS puede medirse usando el estuche de ensayo CellTiter 96® (Promega; Madison, WI).
10 Además, el número de células sometidas a lisis es cuantitativamente proporcional a la conversión catalizada por LDH (lactato deshidrogenasa) de sal de tetrazolio en formazano rojo. El estuche de ensayo Cytotox 96 (Promega) puede usarse para examinar la liberación de LDH.

15 Para tratar los puntos de toxicidad in vivo, puede realizarse una tinción estándar de hematoxilina/eosina (H/E) en el hígado, el riñón, el bazo y el cerebro de un animal (p. ej., un roedor tal como un modelo animal de AD) para buscar cualesquiera anomalías evidentes entre los grupos tratado con extracto y de control. Además, los niveles séricos de nitrógeno de urea en sangre (BUN), aspartato amino transaminasa (ASTSGOT) y fosfatasa alcalina (ALP) pueden verificarse en un animal para evaluar la función renal, el daño hepático y obstrucciones biliares inducidas por fármacos.

Métodos para detectar polipéptidos de A β

20 Métodos para detectar A β en cultivo celular o en una muestra biológica de un individuo (p. ej., plasma o fluido cerebroespinal) son conocidos por los expertos en la especialidad. Se han desarrollado rastreos de alto rendimiento para examinar el nivel de A β 40 o A β 42 en medio acondicionado por una línea celular a lo largo del tiempo. Se describe en la presente memoria un ELISA tipo sándwich altamente específico que usa un anticuerpo BAN-50, que captura específicamente A β en el extremo N, y a continuación bien un anticuerpo BA-27, que detecta sólo polipéptidos de A β de longitud completa que terminan en la posición 40, o bien un anticuerpo BC-05, que detecta sólo polipéptidos de A β de longitud completa que terminan en la posición 42 (Suzuki et ál., 1994, Science, 264:1336-40; Asami-Odaka et ál., 1995, Biochem., 34:10272-8).

30 Anticuerpos adecuados que detectan un epítipo dentro de A β (o dentro de la porción de A β de APP) también están disponibles comercialmente de una variedad de fuentes, incluyendo, pero no limitadas a, Biosource International (Camarillo, CA), Senetek PLC (Londres, Inglaterra), Zymed Laboratories (San Francisco, CA), Peninsula Laboratories (San Carlos, CA) y Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). Varias de las fuentes comerciales listadas en la presente memoria también proporcionan anticuerpos con afinidad de unión específica bien para A β 40 o bien para A β 42. Además, BNT-77 es un anticuerpo que captura A β de roedor (Asami-Odaka et ál., 1995, Biochem., 34:10272-8) que puede usarse junto con los anticuerpos BA-27 o BC-05 descritos anteriormente.

35 Además del ELISA tipo sándwich específico descrito en la presente memoria, otros tipos de inmunoensayos en fase sólida así como transferencias Western o inmunoprecipitaciones pueden usarse para detectar A β y son muy conocidos en la especialidad. Véase Short Protocols in Molecular Biology, Cap. 11, John Wiley & Sons, Ed., Ausubel et ál., 1992. Inmunoensayos en fase sólida incluyen inmunoensayos de competición, inmunoensayos de antígenos inmovilizados, inmunoensayos de anticuerpos inmovilizados e inmunoensayos de doble anticuerpo. Por ejemplo, un inmunoensayo de doble anticuerpo típico para detectar A β pueden incluir las siguientes etapas: ligar un anticuerpo con afinidad de unión para A β a un soporte sólido; exponer el anticuerpo a polipéptido de A β no marcado; lavar para retirar A β no unido; y cuantificar la cantidad de A β unida al anticuerpo inmovilizado usando un exceso de un segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo puede tener afinidad de unión para A β y puede radiomarcarse o conjugarse a un producto químico o una enzima para la detección después de la adición de un sustrato apropiado.

45 La transferencia Western para detectar A β incluye típicamente las etapas de separar electroforéticamente péptidos en o secretados de una célula; transferir los péptidos desde el medio de separación (p. ej., un gel) hasta un soporte sólido (p. ej., nitrocelulosa, nailon); y sondar con anticuerpos con una afinidad de unión para A β . El sondeo puede ser directo (p. ej., un anticuerpo primario marcado) o indirecto (p. ej., un anticuerpo no marcado específico para A β , que subsiguientemente se detecta con un anticuerpo secundario o un reactivo inmunológico, por ejemplo, proteína A o antiinmunoglobulina, marcado).
50

Métodos de inmunoprecipitación de A β incluyen generalmente las siguientes etapas: radiomarcarse células que expresan A β ; someter a lisis a las células; formar complejos inmunitarios específicos entre A β y un anticuerpo con afinidad de unión para A β ; recoger y purificar los complejos inmunitarios; y analizar el A β radiomarcado en el inmunoprecipitado. A menudo se usa inmunoprecipitación para detectar y cuantificar antígenos diana en mezclas complejas de proteínas. Puede usarse inmunoprecipitación para analizar proteínas no marcadas procedentes de células no marcadas, con tal de que estén disponibles métodos suficientemente sensibles para detectar la proteína diana después de que se haya dissociado del anticuerpo.
55

Un marcador detectable, p. ej., un marcador radiactivo (p. ej., ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{132}P , ^{35}S y ^{14}C) o un marcador no radiactivo (p. ej., un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador paramagnético o un marcador enzimático) puede ligarse a un anticuerpo o un fragmento del mismo usando técnicas conocidas para los expertos normales en la especialidad. Ejemplos de marcadores enzimáticos usados habitualmente en la especialidad para detección y cuantificación incluyen peroxidasa de rábano picante (HRP) y fosfatasa alcalina (AP). Los sustratos disponibles para marcadores bien de HRP o bien de AP son conocidos en la especialidad y pueden seleccionarse basándose en el método deseado de formación del complejo detector (p. ej., una señal fluorogénica, quimioluminiscente o colorimétrica).

A β que se ha detectado mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria u otros métodos conocidos para los expertos en la especialidad puede visualizarse o cuantificarse usando métodos habituales en la especialidad, incluyendo la autorradiografía de un marcador radiactivo (p. ej., película de rayos X, obtención de imágenes con fósforo, análisis densitométrico) y espectrofotometría de un marcador fluorescente o de una reacción colorimétrica producida mediante, por ejemplo, un marcador enzimático. Además, un polipéptido no de A β también puede detectarse y cuantificarse usando métodos similares a los descritos en la presente memoria para A β (p. ej., con propósitos de normalización).

Además, puede usarse espectrometría de masas (MS) para detectar y cuantificar polipéptidos de A β . Varios tipos de MS están disponibles y se usan habitualmente en la especialidad, e incluyen MS con transformación de Fourier, MS con trampa de iones, MS de sectores magnéticos, MS cuadrupolar y MS de tiempo de vuelo (TOF). A modo de ejemplo, Ciphergen (Fremont, CA) vende un sistema de biochip para capturar polipéptidos de A β de medio de cultivo o una muestra biológica y utiliza tecnología SELDI (desorción/ionización láser mejorada superficialmente) con TOF-MS para detectar y cuantificar el nivel de polipéptidos de A β .

Las placas neuríticas en el cerebro de un individuo con AD pueden detectarse y/o verificarse in vivo usando un polipéptido de A β covalentemente modificado con una poliamina (p. ej., putrescina, espermidina o espermina) (Wengenack et ál., 2000, Nat Biotechnol., 18:868-72). Un polipéptido de A β modificado con poliamina radiomarcado puede administrarse a un individuo intravenosamente y detectarse usando métodos estándar. Por ejemplo, puede usarse un radiomarcador adecuado para la obtención de imágenes diagnóstica (p. ej., ^{123}I) y detectarse usando tomografía computarizada de emisión de un solo fotón (SPECT).

Producción de extractos de Cimicifuga y fracciones activas de los mismos

La extracción es un procedimiento por el que los constituyentes deseados de una planta o parte de planta se retiran usando un disolvente u otros medios. Generalmente, un extracto de *Cimicifuga* se obtiene de la raíz o el rizoma de la planta, aunque también pueden usarse hojas, tallos y flores. El extracto de *Cimicifuga* o la fracción activa puede ser de *C. racemosa*. Para producir un extracto, en primer lugar, habitualmente el material vegetal se limpia y se seca si es necesario. El secado puede realizarse naturalmente (p. ej., mediante secado al aire) o artificialmente (p. ej., usando ventiladores de aire caliente o secadoras transportadoras). El material vegetal puede triturarse, cortarse o desmenuzarse usando, por ejemplo, acción de martillos, presión, fricción o corte por impacto. Los métodos para retirar los constituyentes deseados del material vegetal incluyen, pero no se limitan a, extracción con disolventes orgánicos, extracción con gases supercríticos y destilación con vapor de agua. A modo de ejemplo, hay un número de procedimientos para la extracción con disolventes orgánicos, incluyendo maceración (embebiendo y agitando el material vegetal con un disolvente), percolación (enjuague repetido del material vegetal con un disolvente) y extracción en contracorriente (flujo continuo de un disolvente en la dirección opuesta al material vegetal). Disolventes representativos incluyen, pero no se limitan a, etanol, benceno, tolueno y éter. También pueden producirse extractos acuosos, tales como decocciones (hirviendo el material vegetal, generalmente usadas para tejidos duros), infusiones (remojo del material vegetal, generalmente usadas para tejidos blandos) o maceraciones, aunque la contaminación microbiana puede ser un problema con los métodos de extracción acuosa. Según se usa en la presente memoria en los métodos de la invención, un extracto de *C. racemosa* puede ser un extracto etanólico o un extracto acuoso, dependiendo de la solubilidad de un componente activo que reduce el nivel de un polipéptido de A β . Los extractos de *Cimicifuga* están disponibles comercialmente e incluyen Remifemin® (SmithKline Beecham, Research Triangle Park, NC) y Black Cohosh (Viable Herbal Solutions, Morrisville, PA; o Whole Health Discount Center, <http://www.WholeHealthDiscountCenter.com>).

Métodos para producir fracciones activas (es decir, que contienen uno o más componentes activos) procedentes de un extracto de *Cimicifuga* se proporcionan mediante la invención. Componentes activos de un extracto de *Cimicifuga* o una fracción activa pueden incluir, pero no se limitan a, polifenoles, flavonoides, ácidos aromáticos, metabolitos, alcaloides, proteínas, carbohidratos, almidones, esteroides, resinas, elementos o combinaciones de los mismos (p. ej., glicoproteínas) que, solos o en combinación con otros componentes, pueden reducir el nivel de un polipéptido de A β . Por ejemplo, la fraccionación mediante extracción con disolventes tradicional emplea el reparto de un soluto entre dos fases inmiscibles, típicamente una fase orgánica (p. ej., n-hexano, dicloruro de metileno, acetato de etilo o n-butanol) y una fase acuosa. La cinética de extracción rápida y la capacidad de utilizar un número de diferentes diluyentes, extractantes y fases acuosas hace a la extracción con disolventes un método de separación potente. Además, pueden emplearse otros numerosos procedimientos de separación para purificar adicionalmente

componentes deseados o retirar componentes no deseados o contaminantes, incluyendo decantación, filtración, sedimentación, centrifugación, calentamiento, adsorción, precipitación, cromatografía o intercambio iónico. La fracción activa resultante puede concentrarse subsiguientemente mediante evaporación, vaporización, liofilización o secado al vacío. Aunque la invención ejemplifica fraccionación usando reparto con disolventes orgánicos, los expertos en la especialidad están al tanto de las ventajas de usar ciertas técnicas de separación en combinación con otras para repartir crecientemente uno o más componentes activos en fracciones activas.

Un método de la invención incluye obtener un extracto de material vegetal de *Cimicifuga* y fraccionar por tamaños el extracto, p. ej., a través de un filtro. El flujo pasante representa una fracción activa. Usando este o un método similar para fraccionar un extracto de *Cimicifuga*, un componente activo dentro de la fracción activa puede pasar a través de un filtro o concentrador de peso molecular nominal de 10 kilodaltons (kD).

Otro método para producir una fracción activa de un extracto de *Cimicifuga* incluye obtener un extracto de material vegetal de *Cimicifuga* y extraer el extracto con hexano (p. ej., n-hexano). La fracción insoluble en hexano puede usarse para reducir el nivel de un polipéptido de A β después del contacto con una célula o puede fraccionarse adicionalmente. Por ejemplo, la fracción insoluble en hexano puede extraerse con un dicloroalcano (p. ej., dicloruro de metileno o dicloroetano). Según se describe en la presente memoria, la fracción soluble en dicloroalcano es capaz de reducir los niveles de A β . Un componente activo dentro de la fracción soluble en dicloroalcano puede repartirse adicionalmente al extraer con un acetato de alquilo (p. ej., acetato de etilo o acetato de metilo) y obtener una fracción soluble en acetato de alquilo. Un componente activo dentro de la fracción soluble en acetato de alquilo puede repartirse adicionalmente al extraer con un disolvente alcohólico (p. ej., n-butanol o 1-pentanol) y obtener la fracción soluble en alcohol. Los expertos en la técnica están al tanto de etapas adicionales durante la fraccionación que pueden facilitar el manejo de la muestra (p. ej., concentrando una fracción activa).

Dados los ensayos basados en células de alto rendimiento descritos en la presente memoria, cientos o miles de fracciones o combinaciones de fracciones pueden rastrearse rápidamente para identificar las que contienen uno o más componentes activos o para identificar fracciones que, cuando se combinan, confieren actividad. Un animal tal como el ratón Tg2576 o un ratón transgénico que tiene una mutación sueca y una mutación en una secuencia de presenilina también puede usarse para evaluar el nivel de A β (p. ej., en plasma o cerebro homogeneizado usando, por ejemplo, el ELISA tipo sándwich descrito en la presente memoria), la carga de placas (p. ej., en tejido cerebral usando, por ejemplo, análisis inmunocitoquímico), el comportamiento/la memoria (p. ej., usando un laberinto acuático de Morris para evaluar la memoria de referencia espacial), u otros indicadores neurológicos tales como diferencias en la astrogliosis, la neuritis distrófica, la microglia y el estado de fosforilación tau (p. ej., mediante análisis inmunocitoquímico de tejido cerebral) después de la administración de un extracto de *Cimicifuga* o una fracción activa.

Un componente activo procedente de un extracto de *Cimicifuga* o una fracción activa que es capaz de reducir niveles de A β puede ser soluble en dicloruro de metileno, acetato de etilo y n-butanol, indicando generalmente un componente activo lipófilo. Los compuestos lipófilos son aquellos que prefieren un ambiente no polar a uno acuoso. Compuestos procedentes de extracto de *C. racemosa* se han identificado previamente usando métodos tales como los descritos en la presente memoria, e incluyen un fitoestrógeno capaz de unirse a receptores de estrógeno, y resinas de cimicifugina y macrotina, que afectan, entre otros, a los sistemas reproductor y nervioso. También se identifican a partir de extractos de *Cimicifuga* glicósidos triterpénicos, incluyendo cimicifugósido, que se cree que afecta al sistema hipotálamo-pituitaria y los sistemas reproductor y nervioso, acteína, un derivado esteroideo que disminuye la presión sanguínea en animales, 27-desoixacteína y racemósido. Se ha identificado que una isoflavona llamada formonenetina se une a receptores de estrógeno en el útero de rata. Se cree que los ácidos aromáticos, incluyendo ácido ferúlico y ácido isoferúlico, son responsables de los efectos antiinflamatorios del extracto.

Composiciones y Artículos de fabricación

También se describe en la presente memoria una composición que contiene una fracción activa de un extracto de *Cimicifuga*. Una composición que contiene una fracción activa de un extracto de *Cimicifuga* puede estar en cualquier forma con tal de que la composición pueda ponerse en contacto con una célula en una cantidad y durante un espacio de tiempo para reducir el nivel de un polipéptido de A β .

Composiciones como las descritas en la presente memoria pueden administrarse con una base continua o intermitente. A modo de ejemplo, una composición como la descrita en la presente memoria para el uso en la invención puede estar en la forma de un líquido, una solución, una suspensión, una píldora, una cápsula, un comprimido, una cápsula de gelatina, un polvo, un gel, una pomada, una crema, una neblina, una bruma, un vapor atomizado o un aerosol. Para el propósito de esta invención, las rutas de administración incluyen, pero no se limitan a, oral, nasal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intratecal, intradérmica o tópica. La ruta de administración puede depender de una variedad de factores, tales como el ambiente en el que se ponen en contacto las células y los fines terapéuticos. Las dosificaciones de una composición particular dependerán de muchos factores, incluyendo el modo de administración y las células que se traten. Típicamente, la cantidad de una fracción activa contenida dentro de una sola dosis de una composición será una cantidad que reduzca eficazmente el nivel

de un polipéptido de A β sin inducir una toxicidad significativa.

Además, las composiciones que se describen en la presente memoria para el uso en la invención pueden contener un portador farmacéuticamente aceptable para la administración in vivo a un mamífero, incluyendo, sin limitación, soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos incluyen, sin limitación, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables. Portadores acuosos incluyen agua, alcohol, solución salina y soluciones tamponadas. Portadores farmacéuticamente aceptables también pueden incluir vehículos acuosos fisiológicamente aceptables (p. ej., solución salina fisiológica o fluido cerebral-espalinal artificial) u otros portadores conocidos apropiados para rutas de administración específicas. Pueden incluirse en una composición compuestos adicionales, tales como esteroides, agentes mucolíticos, agentes antiinflamatorios, inmunosupresores, dilatadores, vasoconstrictores o combinaciones de los mismos. También pueden estar presentes en una composición conservantes, saborizantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

Para la administración oral, pueden prepararse comprimidos o cápsulas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, desintegrantes o agentes humectantes. Los comprimidos pueden revestirse mediante métodos conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para la constitución con solución salina u otro vehículo líquido adecuado antes del uso. Las preparaciones líquidas también pueden contener aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos, conservantes, sales tamponadoras, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes según sea apropiado. Las preparaciones para la administración oral pueden formularse adecuadamente para dar la liberación controlada del compuesto.

También se describe en la presente memoria un artículo de fabricación que incluye una composición que contiene una fracción activa de un extracto de *Cimicifuga* y material de envasado. El material de envasado en o sobre un artículo de fabricación indica que la composición del mismo es eficaz para reducir el nivel de un polipéptido de A β . Componentes y métodos para producir artículos de fabricación son bien conocidos en la especialidad. Pueden incluirse en tales estuches instrucciones, por ejemplo en una etiqueta o un prospecto, que describen una dosis particular de la composición que ha de administrarse. Pueden fabricarse diferentes estuches que contienen una composición en diferentes formas (p. ej., una píldora o un líquido) o que contienen una dosis de una composición apropiada para reducir el nivel de un polipéptido de A β en, por ejemplo, un sujeto hembra adulto o en un sujeto macho adulto (basado en un peso medio). Las instrucciones pueden incluir además una tabla o diagrama para ajustar una dosis particular de una composición para un sujeto que se desvíe de la media.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

35 Ejemplo 1 - Rastreo primario para identificar extractos de *Cimicifuga* o fracciones activas de los mismos que reducen el nivel de un polipéptido de A β in vitro

Los rastreos primarios con cultivos celulares usaban un extracto etanólico de *Cimicifuga* (obtenido de Nature's Answer (www.naturesanswer.com) o Nature's Apothecary (Louisville, CO)), Nature's Answer proporcionaba extractos etanólicos de *Cimicifuga* al 10-14% o 15-20%, mientras que el extracto de *Cimicifuga* proporcionado por Nature's Apothecary era en etanol al 55%. Una dilución apropiada de cada extracto a una concentración final de 0,005%, 0,05% o 0,5% se puso en medio de cultivo en una placa para bibliotecas de microvaloración de baja unión de 96 pocillos a la dilución apropiada. Se incluyeron controles de vehículo y acetamidofenol 30 mM en pocillos separados en cada placa para bibliotecas para determinar cualesquiera alteraciones inducidas por el vehículo en el nivel de A β , y para la evaluación de la toxicidad, respectivamente (se ha mostrado que el acetaminofeno es tóxico para las células). Los extractos de *Cimicifuga* diluidos y los controles procedentes de la placa para bibliotecas se pusieron directamente a continuación sobre células H4 β APP695wt confluentes en una placa de cultivo celular de 96 pocillos mediante una pipeta de varios canales. Después de la incubación durante 12 h, el medio se retiró mediante una pipeta de varios canales e inmediatamente partes alícuotas se pusieron directamente sobre placas para ELISA tipo sándwich de 96 pocillos para la medida de A β 40 o A β 42 y sobre una placa de ensayo de LDH de 96 pocillos. A continuación, las células se lavaron y se sometieron a un ensayo de MTS de 96 pocillos.

En particular, el ELISA tipo sándwich usado en la presente memoria se realizó como sigue: placas de microvaloración de 96 pocillos se revistieron durante la noche a 4°C con 100 μ l de una dilución de 5 μ g/ml de anticuerpo primario en tampón de revestimiento de carbonato sódico (SCCB; Na₂CO₃ 0,1 M, pH 9,6). Las placas se bloquearon durante la noche a 4°C con 300 μ l de Block Ace Solution (PBS + Block Ace (Snow Brand Milk Products, Japón) al 1,0%, NaN₃ al 0,05%, pH 7,4). Las muestras para análisis y los patrones de A β sintéticos (Bachem, Suiza) se diluyeron en tampón EC (NaH₂PO₄ 0,02 M, EDTA 0,002 M, NaCl 0,4 M, BSA al 0,2%, CHAPS al 0,05%, Block Ace al 0,04%, NaN₃ al 0,05%, pH 7,0) y se dejaron incubar sobre las placas durante la noche a 4°C. Las placas se

lavarón dos veces con PBS (Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, NaCl 139 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4) y 100 μl de anticuerpo secundario directamente acoplado a HRP (estuche Pierce EZ-link Plus Activated Peroxidase, de acuerdo con las directrices del fabricante; Pierce Chemical Co., Rockford, IL) se dejaron unirse bien 4 h a temperatura ambiente o bien durante la noche a 4°C. A continuación, las placas se lavaron dos veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% seguido por dos lavados adicionales en PBS. La detección se realizó usando la TMB (3,3',5,5'-tetrametil-benzidina) como un sustrato de HRP de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Kirkegaard & Perry Laboratories (KPL), Gaithersburg, MD) y la reacción se detuvo mediante la adición de 100 μl de H_3PO_4 1 N. Las placas se leyeron a 450 nm en un espectrofotómetro SpectraMax Plus (Molecular Devices; Sunnyvale, CA) y se analizaron mediante el software SOFTmax® PRO. A β 40 o A β 42 se cuantificaron mediante comparación con los valores obtenidos para cada patrón de A β sintético procedente de la misma placa.

Ejemplo 2 - Análisis de respuesta a la dosis de extracto de *C. racemosa* sobre el nivel de polipéptidos A β 40 y A β 42

Se observó una reducción estadísticamente significativa en el nivel de A β 42 a todas las concentraciones y con cualquier extracto de *C. racemosa* examinado. El efecto específico sobre A β 42 tenía una meseta a aproximadamente 50% de inhibición. A concentraciones mayores de 0,15%, el nivel de A β 40 también empezaba a disminuir en presencia de extracto de *C. racemosa*. La reducción en A β 40 observada a las dosis superiores podría deberse a la presencia de uno o más de otros componentes dentro del extracto que reducen bien el A β total o bien específicamente A β 40, o a efectos solapados sobre A β 40 y A β 42 por el mismo componente.

Ejemplo 3 – El extracto de *C. racemosa* no afecta significativamente a la acumulación de APP, fragmento carboxiloterminales α (CTF α), CTF β o sAPP α

APP, CTF β y CTF α se analizaron en lisados celulares extraídos con detergente mediante transferencia Western usando un anticuerpo dirigido contra los últimos 20 aminoácidos de APP (proporcionado por el Dr. K. Sambamurti, Mayo Clinic, Jacksonville, FL). CTF β se produce, junto con sAPP β , después de la segmentación con β -secretasa de APP, mientras que CTF α y sAPP α se producen después de la segmentación de APP mediante α -secretasa. sAPP α se detectó en medio acondicionado usando el anticuerpo BAN-50 contra residuos de A β 1-16. El extracto de *C. racemosa* no tenía un efecto significativo sobre los niveles en estado estacionario de APP, CTF α , CTF β o sAPP α . Por lo tanto, el efecto del extracto de *C. racemosa* sobre A β 42 era específico con respecto a los efectos sobre el procesamiento de APP.

Ejemplo 4 - Múltiples lotes de extracto de *C. racemosa* procedentes de diferentes vendedores muestran reducciones específicas en A β 42

Para examinar la uniformidad de las preparaciones de extractos de *C. racemosa*, se examinó la varianza entre extractos de fabricantes. Células H4 β APP695wt se trataron con extractos etanólicos de *C. racemosa* obtenidos de 2 fabricantes separados (Nature's Answer, etanol al 10-14% o 15-20%; o Nature's Apothecary, etanol al 55%). Las células se trataron con una concentración final de 0,1% de extracto de *C. racemosa*. Los extractos de *C. racemosa* procedentes de cada fabricante mostraban una reducción similar en A β 42.

Ejemplo 5 – Rastros secundarios usando ratones Tg2576 para identificar extractos o fracciones activas de los mismos que reducen el nivel de polipéptidos de A β in vivo

En primer lugar, un extracto desalcoholizado o fracciones activas del mismo se administran a ratones Tg2576 hembra jóvenes de 4 semanas de edad, de edades coincidentes. El efecto de la administración de un vehículo apropiado se usa para animales de control. Después de una sola administración del extracto de prueba mediante sonda, los ratones son sacrificados a intervalos de tiempo definidos y los cerebros se analizan con respecto al A β . Se eligen ratones de 4 semanas de edad de modo que el A β se analice en ausencia de cualquier deposición detectable. 24 ratones fueron asignados a un grupo de dosis de trabajo y el mismo número a un grupo de dosis máxima. Para el grupo de dosis de trabajo, la dosis del extracto aportada a los ratones es igual a la dosis máxima ajustada para el peso corporal presentada para el uso en seres humanos. Para el grupo de dosis máxima, se administran 250 μl (es decir, el volumen máximo que puede administrarse de forma segura mediante sonda a ratones de esta edad). 6 ratones son sacrificados a cada una de las 6, 12, 24 y 48 h después de la administración. Se obtiene plasma por medios convencionales a partir de una hemorragia terminal y el cerebro se extrae y se congela inmediatamente para el análisis usando el ELISA tipo sándwich descrito en la presente memoria. Se observa una reducción significativa en A β 42 en el grupo de tratamiento cuando se compara con los controles ($p < 0,05$, Mann-Whitney).

En segundo lugar, el extracto o las fracciones activas se administran durante 2 semanas a ratones de 4 semanas de edad usando la dosis de trabajo y la dosis máxima según se describen anteriormente. Se tratan 6 ratones por dosis. Como la concentración de fármaco se aproxima al estado estacionario en 4 semividas, este espacio de tiempo permite el análisis del estado estacionario de componentes activos con semividas de hasta 3-4 días.

En tercer lugar, se empieza la dosificación de los ratones a los 4 meses de edad (antes de la deposición detectable de A β) y son dosificados durante 10 meses hasta que alcanzan los 14 meses de edad. Esta edad se selecciona para el sacrificio ya que es uno de los períodos más tempranos en los que es evidente patología y se han presentado diferencias de comportamiento. 15 ratones son asignados a cada grupo de prueba. Los animales de control reciben vehículo solo. Los ratones son evaluados durante el período de 10 meses con respecto a los cambios de comportamiento y, al final del experimento, son sacrificados para determinar la extensión de la formación de las placas, la acumulación de A β y otra neuropatología evidente en el ratón Tg2576. Una mitad del cerebro se procesa para la cuantificación de A β mediante ELISA y una mitad se prepara para el análisis inmunohistoquímico. El tratamiento con extracto de *C. racemosa* da como resultado una reducción significativa en A β 42 en el grupo de animales de más edad ($p < 0,05$, Mann-Whitney).

La presencia de abundantes placas seniles en todo el hipocampo y el neocórtex es una señal distintiva patológica de la enfermedad de Alzheimer. Se realiza un análisis inmunohistoquímico ciego sobre los ratones tanto de control como tratados con fármaco a partir del último grupo para determinar el efecto del extracto de *C. racemosa* sobre la acumulación de placas seniles. El tratamiento con extracto de *C. racemosa* da como resultado una reducción significativa en el número de placas según se evalúa usando anticuerpos específicos para A β . En secciones adyacentes, la mayoría de las placas inmunorreactivas también son positivas mediante microscopía fluorescente con tioflavina-S. El área total ocupada por estas placas se determina mediante análisis de imágenes de secciones inmunoteñidas. Se observa una reducción en el área en los ratones tratados con fármaco.

Ejemplo 6 – Evaluación in vivo de extracto de *C. racemosa*

20 2 μ l de extracto de *C. racemosa* se administraron a través de una cánula intracerebroventricular a ratones CD-1 hembra (Taconic). Los animales de control recibían vehículo solo. Después del tratamiento, los cerebros se extirparon y se extrajeron con ácido fórmico al 70% para el análisis de A β según se describe en la presente memoria.

25 Extracto de *C. racemosa* se administró a ratones mediante inyecciones intracerebroventriculares (icv) directas para evaluar el efecto in vivo del extracto sobre los niveles de A β 40 y A β 42. Los ratones recibían una sola dosis bien de 2 μ l del extracto de *C. racemosa* (tratados) o bien 2 μ l de vehículo solo (control). Tres horas después de la administración, los ratones fueron sacrificados y la cantidad de A β 40 y A β 42 en el cerebro se cuantificó mediante ELISA tipo sándwich a partir de extractos de ácido fórmico. Los animales tratados con el extracto de *C. racemosa* mostraban una reducción de 31,4% en los niveles de A β 42 en el cerebro ($n=4$ animales por grupo, $p = 0,016$).

Ejemplo 7 – Fracciones activas de un extracto de *C. racemosa*

35 Para valorar la solubilidad y determinar el tamaño molecular del componente activo en extracto de *C. racemosa*, se realizó un experimento de centrifugación y exclusión por tamaño. La actividad de un extracto etanólico de *C. racemosa*, el material soluble después de una rotación de 15.000 g y el flujo pasante desde una centrifugación usando una unidad de filtración con un corte de peso molecular de 10 kD se examinaron en cultivos celulares. Estos resultados indicaban que el componente activo en el extracto de *C. racemosa* era soluble y podía pasar a través de un filtro de 10 kD de corte. Experimentos adicionales demostraban que el componente activo puede pasar fácilmente a través de un filtro de un corte de membrana de 5 kDa, indicando de ese modo que el componente activo no es una macromolécula grande.

40 Para examinar la estabilidad del componente activo en el extracto de *C. racemosa*, el extracto se hirvió durante 5 min y a continuación se analizó usando el ensayo basado en células en una comparación paralela con extracto no hervido. El análisis del extracto hervido frente al no hervido sobre células H4 β APP695 mostraba una reducción esencialmente equivalente en el nivel de A β , demostrando que un componente activo dentro de un extracto de *Cimicifuga* es termoestable.

45 El análisis de solubilidad ha demostrado que el componente activo es extraíble y activo en etanol, DMSO, acetato de etilo y acetonitrilo. Se ha realizado una separación limitada dando como resultado un incremento significativo en la actividad específica y un incremento significativo en el efecto contra A β 42 (reducción de 75% en A β 42 sin ningún efecto observable sobre A β 40).

Ejemplo 8 – Identificación y aislamiento guiados por bioensayo de un componente activo dentro de extracto de *C. racemosa*

50 Un extracto etanólico de *C. racemosa* se sometió a rotación a 15.000 x g para retirar el material en partículas. El sobrenadante se liofilizó y se resuspendió en agua destilada. A continuación, esta suspensión se extrajo secuencialmente en hexano, dicloruro de metileno, acetato de etilo y n-butanol. Los extractos de disolvente y el agua restante se dividieron en partes alícuotas y se trataron en rotavapor/se liofilizaron. Una parte alícuota de cada uno se resuspendió en etanol, se diluyó a diversas concentraciones en medio de cultivo celular H4 y se analizó con

5 respecto a la actividad en los ensayos basados en células. Etanol puro se diluyó de forma similar como un control y el extracto original se diluyó y se analizó en el ensayo basado en células para determinar cualquier incremento sustancial en la actividad. La fracción soluble en dicloruro de metileno, la fracción soluble en acetato de etilo y la fracción soluble en n-butanol demostraban todas la capacidad para reducir el nivel de A β en el ensayo basado en células.

10 El extracto de disolvente que contiene actividad se somete a continuación a TLC preparativa seguida por HPLC o HPLC directamente según sea apropiado. Las fracciones de HPLC se analizan a continuación en el ensayo basado en células. La fracción con la actividad más alta se somete a análisis espectral de masas, IR y de NMR para la identificación de la estructura. Etapas de separación adicionales como las analizadas en la presente memoria pueden incluirse según sea necesario.

OTRAS REALIZACIONES

15 Ha de entenderse que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción precedente está destinada a ilustrar y no a limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance las las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para reducir el nivel de un polipéptido de β -amiloide (A β) en o secretado de una célula in vitro, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con una cantidad de un extracto de *Cimicifuga* o de una fracción activa del mismo eficaz para reducir el nivel de dicho polipéptido de A β en o secretado de dicha célula y verificar el nivel de dicho polipéptido de A β en o secretado de dicha célula.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho extracto de *Cimicifuga* o fracción activa del mismo es de *C. racemosa*.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho extracto de *C. racemosa* o fracción activa del mismo se obtiene a partir de la raíz o el rizoma de una planta de *C. racemosa*.
- 10 4. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho extracto de *C. racemosa* es un extracto etanólico o un extracto acuoso.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que un componente activo dentro de dicha fracción activa es soluble en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en dicloruro de metileno, acetato de etilo y n-butanol.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho componente activo es lipófilo.
- 15 7. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que un componente activo dentro de dicha fracción activa tiene un peso molecular de menos de 10 kD.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha célula se selecciona del grupo que consiste en células H4, células M17, células 293, células de ovario de hámster chino (CHO), fibroblastos primarios, C6, cultivos neuronales primarios, cultivos cerebrales mixtos primarios, Daoy, SK-N-SH, SK-N-AS y SK-N-FI.
- 20 9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha reducción en el nivel de dicho polipéptido de A β se debe a una producción disminuida de dicho polipéptido de A β o un catabolismo incrementado de dicho polipéptido de A β .
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho nivel de dicho polipéptido de A β se reduce en al menos 10% en comparación con el nivel de dicho polipéptido de A β en o secretado de una célula correspondiente que no se pone en contacto con dicho extracto o fracción activa del mismo.
- 25 11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho nivel de polipéptido de A β se reduce en al menos 25% en comparación con el nivel de dicho polipéptido de A β en o secretado de una célula correspondiente que no se pone en contacto con dicho extracto o fracción activa del mismo.
- 30 12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho nivel de dicho polipéptido de A β se reduce en al menos 50% en comparación con el nivel de dicho polipéptido de A β en o secretado de una célula correspondiente que no se pone en contacto con dicho extracto o fracción activa del mismo.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho nivel de dicho polipéptido de A β se reduce en al menos 80% en comparación con el nivel de dicho polipéptido de A β en o secretado de una célula correspondiente que no se poen en contacto con dicho extracto o fracción activa del mismo.
- 35 14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido de A β es A β 40.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido de A β es A β 42.
16. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha reducción es preferente para A β 42.
17. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho extracto o fracción activa del mismo no tiene un efecto significativo sobre el nivel de uno o más de APP, CTF α , CTF β o sAPP α .
- 40 18. Un extracto de *Cimicifuga* o una fracción activa del mismo para el uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer en un mamífero.
19. El extracto de *Cimicifuga* o la fracción activa del mismo de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dicho extracto o fracción activa del mismo se administra oralmente, intravenosamente, intracranealmente, intracerebralmente, subcutáneamente, intramuscularmente, intranasalmente o intraperitonealmente.

20. El extracto de *Cimicifuga* o la fracción activa del mismo de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dicho mamífero es un roedor.
21. El extracto de *Cimicifuga* o la fracción activa del mismo de acuerdo con la reivindicación 20, en donde dicho roedor es un ratón.
- 5 22. El extracto de *Cimicifuga* o la fracción activa del mismo de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicho ratón expresa una APP que tiene una mutación sueca.
23. El extracto de *Cimicifuga* o la fracción activa del mismo de acuerdo con la reivindicación 22, en donde dicho roedor es un ratón Tg2576.
- 10 24. Uso de un extracto de *Cimicifuga* o una fracción activa del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer.
25. Un método para producir una fracción activa de un extracto de *Cimicifuga*, en el que dicha fracción activa reduce el nivel de un polipéptido de A β durante el contacto con una célula que produce dicho polipéptido de A β , comprendiendo dicho método:
- obtener un extracto de material vegetal de *Cimicifuga*;
- 15 fraccionar por tamaños dicho extracto a través de un filtro para obtener una fracción activa, en donde dicha fracción activa comprende componentes activos que tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 10 kD; y
- probar dicha fracción activa para confirmar que dicha fracción activa reduce el nivel de dicho polipéptido de A β durante el contacto con dicha célula que produce dicho polipéptido de A β .
- 20 26. Un método para producir una fracción activa de un extracto de *Cimicifuga*, en el que dicha fracción activa reduce el nivel de un polipéptido de A β durante el contacto con una célula que produce dicho polipéptido de A β , comprendiendo dicho método:
- obtener un extracto de material vegetal de *Cimicifuga*;
- 25 extraer dicho extracto de *Cimicifuga* con hexano, produciendo de ese modo una fracción soluble en hexano y una fracción insoluble en hexano; y
- probar dicha fracción insoluble en hexano para confirmar que dicha fracción insoluble en hexano reduce el nivel de dicho polipéptido de A β durante el contacto con dicha célula que produce dicho polipéptido de A β .
27. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en el que dicho hexano es n-hexano.
28. El método de acuerdo con la reivindicación 26, que comprende además:
- 30 extraer dicha fracción insoluble en hexano con un dicloroalcano, produciendo de ese modo una fracción soluble en dicloroalcano y una fracción insoluble en dicloroalcano, en donde dicha fracción soluble en dicloroalcano reduce en nivel de dicho polipéptido de A β durante el contacto con dicha célula que produce dicho polipéptido de A β .
29. El método de acuerdo con la reivindicación 28, en el que dicho dicloroalcano es dicloruro de metileno.
- 35 30. El método de acuerdo con la reivindicación 28, que comprende además:
- extraer dicha fracción soluble en dicloroalcano con un acetato de alquilo, produciendo de ese modo una fracción soluble en acetato de alquilo y una fracción insoluble en acetato de alquilo, en donde dicha fracción soluble en acetato de alquilo reduce el nivel de dicho polipéptido de A β durante el contacto con dicha célula que produce dicho polipéptido de A β .
- 40 31. El método de acuerdo con la reivindicación 30, en el que dicho acetato de alquilo es acetato de etilo.
32. El método de acuerdo con la reivindicación 30, que comprende además:

extraer dicha fracción soluble en acetato de alquilo con un alcohol, produciendo de ese modo una fracción soluble en alcohol y una fracción insoluble en alcohol, en donde dicha fracción soluble en alcohol reduce el nivel de dicho polipéptido de A β durante el contacto con dicha célula que produce dicho polipéptido de A β .

33. El método de acuerdo con la reivindicación 32, en el que dicho alcohol es n-butanol.

5 34. El método de acuerdo con la reivindicación 26, que comprende además concentrar dicho extracto de *Cimicifuga* antes de dicha extracción con hexano, en el que dicha concentración comprende liofilizar dicho extracto de *Cimicifuga*.