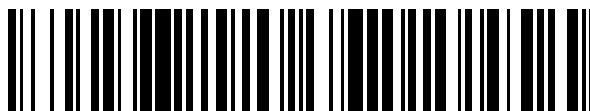


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 709**

51 Int. Cl.:

A61K 36/64 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2003 E 03016069 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 1498131**

54 Título: **Preparación medicinal que contiene glicósidos feniletanoides extraídos de Cistanche tubulosa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2014

73 Titular/es:

**SINPHAR PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
7F, 48 CHIN CHOU STREET
TAIPEI, TW**

72 Inventor/es:

**TU, PENGFEI;
SONG, ZHIHONG y
LEI, LI**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 456 709 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

Preparación medicinal que contiene glicósidos feniletanoides extraídos de *Cistanche tubulosa*

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, a una preparación medicinal derivada de una planta herbácea, y más particularmente a una preparación medicinal que contiene glicósidos feniletanoides que se extraen de una planta herbácea que pertenece al género *Cistanche*. La preparación se usa como un principio activo de un fármaco capaz de prevenir la demencia senil. La presente invención también incluye un procedimiento para la fabricación de la preparación medicinal así como los usos de la preparación medicinal.

Antecedentes de la invención

10 Las personas de edad avanzada son vulnerables generalmente a diversos deterioros físicos y mentales para los que a menudo no existe un remedio universal. La demencia senil es uno de estos casos. Sin embargo, existe la evidencia clínica de que los tallos carnosos de las hierbas que pertenecen al género *Cistanche* son eficaces en el tratamiento de infertilidad, impotencia, estreñimiento, etc. Además, la preparación hecha de los tallos carnosos de hierbas perennes tales como las que se han descrito anteriormente es nutritiva para la sangre y el riñón. Estas
15 hierbas parásitas y perennes se cultivan extensamente en las provincias del noroeste de China y se conocen localmente como "ginseng del desierto". La especie del género *Cistanche* cultivada con mayor abundancia es *Cistanche tubulosa* (*Schrenk.*) *Wight*.

20 De acuerdo con una investigación sistemática realizada por científicos japoneses sobre los constituyentes químicos y las actividades farmacológicas de las hierbas perennes (género *Cistanche*), los glicósidos feniletanoides son los principios activos principales de estas hierbas perennes. Tales ingredientes activos son eficaces antioxidantes, estimulantes metabólicos, potenciadores de la memoria, potenciadores sexuales, etc. Numerosos investigadores han estudiado las propiedades medicinales de diversos compuestos glicósidos feniletanoides. Para tal información, se hace referencia a las siguientes publicaciones: Sato T., y col. *Yakugaku Zasshi*, 1985, 105 (12): 1131; Jimenez C, y col. *Nat Prod Rep*, 1994, 11 (6): 591; Cometa F., y col. *Fitoterapia*, 1993, 64(3): 195.

Sumario de la invención

25 Los inventores de la presente invención han empleado más de diez años de experiencias de investigación sobre las hierbas perennes del género *Cistanche*. Entre todas las especies del género *Cistanche*, una especie, *Cistanche tubulosa* (*Schrenk.*) *Wight*, contiene la mayor cantidad de compuestos glicósidos feniletanoides. Los inventores de la presente invención presentan un nuevo procedimiento para la extracción de glicósidos feniletanoides de *Cistanche tubulosa* (*Schrenk.*) *Wight*, así como una preparación medicinal que contiene glicósidos feniletanoides. Como
30 resultado de un cierto número de ensayos farmacológicos realizados por los inventores de la presente invención, se comprobó que la preparación medicinal tiene un efecto significativo sobre la potenciación de la memoria, prevención de trombosis, inhibición de la agregación de plaquetas sanguíneas, etc.

35 El objetivo principal de la presente invención es proporcionar una preparación medicinal que contiene glicósidos feniletanoides que se extraen de una planta herbácea, *Cistanche tubulosa* (*Schrenk.*) *Wight*. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para fabricar la preparación medicinal que contiene glicósidos feniletanoides. Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar una composición medicinal para la prevención de demencia senil.

40 La preparación medicinal de la presente invención contiene un 25-70 % de equinacósido en peso de la preparación, y un 5-40 % de acteósido en peso de la preparación.

Preferentemente, la preparación medicinal de la presente invención está hecha de tallos carnosos de *Cistanche tubulosa* (*Schrenk.*) *Wight*.

45 Preferentemente, la preparación medicinal de la presente invención contiene además 2'-acetilacteósido; campneósido I; campneósido II; cistantubulósido A, B₁, B₂, C₁, C₂; crenatósido; decafeoilacteósido; isoacteósido; rodolósido; siringalida A; 3'- α -L-ramnopiranosido, y tubulósido A, estando cada uno en una cantidad menor de un 5 % en peso de la preparación medicinal.

50 El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 de la presente invención para la fabricación de la preparación medicinal implica una primera etapa en la que se extraen las partes subterráneas de *Cistanche tubulosa* (*Schrenk.*) *Wight* mediante un primer disolvente polar. El extracto obtenido de este modo se introduce a continuación en una columna que está empaquetada con perlas poliméricas macroporosas hidrofóbicas, permitiendo de este modo que los glicósidos feniletanoides se adsorban sobre las perlas poliméricas. Los compuestos adsorbidos con una fuerza relativamente menor se eluyen a continuación de la columna mediante el uso de un segundo disolvente polar que sirve como fase móvil, quedando la mayoría de los glicósidos feniletanoides adsorbidos sobre las perlas poliméricas. Finalmente, se eluyen los glicósidos feniletanoides de la columna mediante el uso de un tercer disolvente polar de
55 modo que se obtiene un eluato que contiene glicósidos feniletanoides. El tercer disolvente polar tiene una polaridad

menor que el segundo disolvente polar.

5 Preferentemente, las partes subterráneas de *Cistanche tubulosa* (Schrenk.) Wight son tallos carnosos. Las partes subterráneas que se mezclan con el primer disolvente polar, y la mezcla resultante, se mantienen en cocción durante un período de 0,5-10 horas de duración. Posteriormente, la mezcla se filtra para obtener una solución. La solución es un extracto, que puede estar en una forma concentrada mediante descompresión. Preferentemente, la mezcla contiene las partes subterráneas de *Cistanche tubulosa* (Schrenk.) Wight y el primer disolvente polar en una proporción en peso que varía de 1:4 a 1:20. El primer disolvente polar es agua, o un disolvente mixto que contiene agua y alcohol etílico. Preferentemente, la perla polimérica de la columna que se usa en el procedimiento de la presente invención es un compuesto poliaromático reticulado. Más preferentemente, la perla polimérica está formada por poliestireno reticulado, o un copolímero de estireno y divinilbenceno reticulado. El segundo disolvente polar es agua. El tercer disolvente polar es metanol, etanol, una mezcla de agua y metanol, o una mezcla de agua y etanol. Más preferentemente, el tercer disolvente polar es una mezcla de agua y etanol.

El procedimiento de la presente invención comprende además retirar el disolvente que está contenido en el eluato producido de ese modo, dando como resultado de esa manera la producción de una preparación seca.

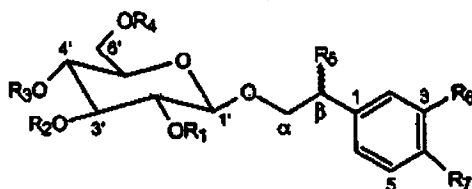
15 La preparación de la presente invención se puede usar para fabricar una composición medicinal para la prevención de demencia senil. La composición medicinal contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de la preparación como principio activo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para el principio activo.

La composición medicinal contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de la preparación y un vehículo o diluyente medicinalmente admisible. La preparación se usa como un principio activo del compuesto.

20 La presente invención también desvela el uso de la preparación de la presente invención en la fabricación de un medicamento para la prevención y el tratamiento de una enfermedad de demencia senil en un paciente.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención proporciona una preparación que contiene compuestos glicósidos feniletanoides de *Cistanche tubulosa* (Schrenk.) Wight, que contiene un 25-70 % de equinacósido en peso de la preparación, y un 5-40 % de acteósido en peso de la preparación. Los compuestos glicósidos feniletanoides derivados de *Cistanche tubulosa* (Schrenk.) Wight tienen la siguiente estructura química:



30 e incluyen 2'-acetilacteósido; campneósido I; campneósido II; cistantubulósido A, B₁, B₂, C₁, C₂; crenatósido; decafeoilacteósido; isoacteósido; rodiolósido; siringalida A; 3'-α-L-ramnopiranosido, y tubulósido A, que se muestran en la Tabla 1, en la que la mayoría de los compuestos están en una cantidad mínima o como traza en la preparación, excepto el equinacósido y el acteósido.

Tabla 1. Ingredientes principales de la preparación

Ingrediente	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
2'-Acetilacteósido	Ac	Rha	Cf	H	H	OH	OH
Acteósido	H	Rha	Cf	H	H	OH	OH
Campneósido I	H	Rha	Cf	H	OMe(S/R)	OH	OH
Campneósido II	H	Rha	Cf	H	OH(S/R)	OH	OH
*Cistantubulósido A	H	Rha	Cf	Glc	H	H	OH
*Cistantubulósidos B ₁ /B ₂	H	Rha	Cm/c-Cm	Glc	H	OH	OH
*Cistantubulósidos C ₁ /C ₂	H	Rha	Cf	Glc	OH(S/R)	OH	OH
Decafeoilacteósido	H	Rha	H	H	H	OH	OH

(continuación)

Ingrediente	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Equinacósido	H	Rha	Cf	Glc	H	OH	OH
Isoacteósido	H	Rha	H	Cf	H	OH	OH
Rodiolósido	H	H	H	H	H	H	OH
(Salidrósido)							
Siringalida A							
3'- α -L-ramnopiranosido	H	Rha	Cf	H	H	H	OH
Tubulósido A	Ac	Rha	Cf	Glc	H	OH	OH
Crenatósido	Véase la siguiente estructura						

* nuevo compuesto

Ac: Acetil

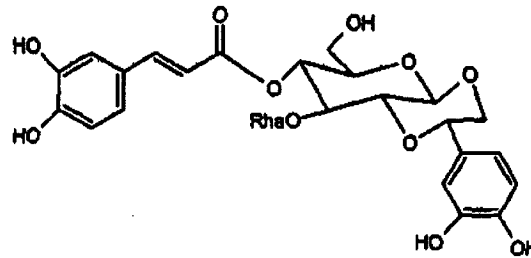
Cf: trans-cafeoil

Cm: trans-cumaroil

c-Cm: cis-cumaroil

Glc: β -D-glucopiranososa

Rha: α -L-ramnopiranososa



crenatósido

5 Todos los compuestos que se listan en la Tabla 1 se verificaron por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento, que se obtuvo en las siguientes condiciones: fase estacionaria de silicona de alquilsilano C18; fase móvil de acetonitrilo-solución acuosa 0,05 M de ácido fosfórico (elución en gradiente (4:96→15:85)), caudal de 1 ml/min, y longitud de onda de detección de 330 nm.

10 El procedimiento de fabricación de la preparación medicinal de la presente invención se describe explícitamente en lo sucesivo en el presente documento. El procedimiento de la presente invención implica dos etapas, que son extracción y purificación. En la primera etapa, los tallos carnosos de *Cistanche tubulosa* (Schrenk.) Wight se cortan en escamas o se trituran en partículas finas o polvo. Las escamas o las partículas finas se sumergen a continuación en un medio que es agua, o una mezcla de agua y etanol. La extracción se realiza a temperatura ambiente. El filtrado se concentra al vacío, dando como resultado de esa manera la formación de un extracto. La purificación del extracto se hace por calentamiento del extracto en agua antes de que el extracto se transfiera a una columna de adsorción empaquetada con resina de adsorción macroporosa de tipo D-101 o de tipo AB-8. La columna se eluye con agua. La elución se puede realizar con una solución de una concentración constante o con soluciones de concentraciones en gradiente. Se recoge el eluato, se concentra y a continuación se seca mediante un procedimiento de secado convencional. Después de completar el secado del eluato, se obtiene la preparación medicinal de la presente invención. La preparación medicinal producida de ese modo contiene glicósidos feniletanoides y se usa para fabricar composiciones medicinales para su uso en la prevención de demencia senil.

25 El ensayo farmacológico de la preparación medicinal de la presente invención se realizó mediante el denominado "experimento del laberinto de agua", en el que se proporciona un grupo de ensayo de ratones pequeños con una dieta que contiene la preparación medicinal de la presente invención. En comparación con el grupo de control, se potenció la memoria de aprendizaje del ratón pequeño del grupo de ensayo, y se redujo aparentemente la pérdida de memoria del grupo de ensayo debida a etanol o fármacos. De forma similar, también se desvela en el presente documento la provisión de un grupo de ratas con una dieta que contenía la preparación medicinal. Mediante la comparación, se comprobó que estas ratas eran menos vulnerables a trombosis, o a la agregación de plaquetas sanguíneas. Basándose en los resultados del ensayo farmacológico descrito anteriormente, se realizó un ensayo clínico para estudiar el efecto de la preparación medicinal de la presente invención en la prevención y el tratamiento de demencia senil, incluyendo VD y AD.

La extracción, purificación, y efecto farmacológico de la preparación medicinal de la presente invención se explicará adicionalmente por referencia a las siguientes realizaciones y ejemplos comparativos no restrictivos.

EXTRACCIÓN:

Realización 1

- 5 Se sumergieron 10 kg de las escamas de tallos carnosos de *Cistanche tubulosa* (Schrenk.) Wight en agua en una cantidad que era 8 veces la de las escamas. Las escamas se sumergieron en el agua durante una hora antes de cocerse con el agua durante dos horas. La mezcla cocida se filtró para obtener un primer filtrado. El residuo se coció a continuación con agua en una cantidad que era 6 veces la del residuo y la mezcla cocida se filtró para obtener un segundo filtrado. Se obtuvo también un tercer filtrado mediante los mismos procedimientos que los del segundo filtrado. Los tres filtrados se combinaron y se concentraron al vacío hasta tener una gravedad específica de 1,10 (50 °C). El filtrado en forma concentrada se mezcló con etanol para formar una mezcla que contenía un 60 % de etanol, que se refrigeró a continuación durante 12 horas. Después de esto, se cosechó el sobrenadante de la mezcla enfriada y mientras tanto se filtró el residuo para obtener un filtrado, que se combinó con el sobrenadante para formar un extracto final. El extracto final se concentró al vacío hasta tener una gravedad específica de 1,10 (50 °C), en el que se recicló el etanol. El extracto final producido de ese modo tenía un peso de 5,6 kg.

Realización 2

- 20 Se sumergieron 10 kg de los tallos carnosos de *Cistanche tubulosa* (Schrenk.) Wight en forma de polvo en agua en una cantidad que era 15 veces la del polvo durante 2 horas, y a continuación se cocieron durante 3 horas. Después de esto, la mezcla cocida se filtró para obtener un primer filtrado, y mientras tanto el residuo de la mezcla cocida se mezcló con agua en una cantidad que era 12 veces la del residuo, se coció durante 2 horas y se filtró para obtener un segundo filtrado. El procedimiento se repitió otras dos veces para obtener un tercer filtrado y un cuarto filtrado. Los cuatro filtrados se combinaron y se concentraron al vacío hasta tener una gravedad específica de 1,25 (50 °C). El filtrado en forma concentrada se mezcló con etanol para formar una mezcla que contenía un 80 % de etanol, que se refrigeró a continuación durante 24 horas. Después de esto, se cosechó el sobrenadante de la mezcla enfriada y mientras tanto se filtró el residuo para obtener un filtrado, que se combinó con el sobrenadante para formar un extracto final. El extracto final se concentró al vacío hasta tener una gravedad específica de 1,25 (50 °C), en el que se recicló el etanol. El extracto final producido de ese modo tenía un peso de 7,2 kg.

Realización 3

- 30 Se sumergieron 10 kg de las escamas de tallos carnosos de *Cistanche tubulosa* (Schrenk.) Wight en agua en una cantidad que era 7 veces la de las escamas. Las escamas se sumergieron en el agua durante tres horas antes de cocerse con el agua durante cuatro horas. La mezcla cocida se filtró para obtener un primer filtrado. El residuo se coció a continuación con agua en una cantidad que era 5 veces la del residuo y la mezcla cocida se filtró para obtener un segundo filtrado. Se obtuvieron también un tercer filtrado y un cuarto filtrado mediante los mismos procedimientos que los del segundo filtrado. Los cuatro filtrados se combinaron y se concentraron al vacío hasta tener una gravedad específica de 1,05 (50 °C). El filtrado en forma concentrada se mezcló con etanol para formar una mezcla que contenía un 50 % de etanol, que se refrigeró a continuación durante 10 horas. Después de esto, se cosechó el sobrenadante de la mezcla enfriada y mientras tanto se filtró el residuo para obtener un filtrado, que se combinó con el sobrenadante para formar un extracto final. El extracto final se concentró al vacío hasta tener una gravedad específica de 1,10 (50 °C), en el que se recicló el etanol. El extracto final producido de ese modo tenía un peso de 6,5 kg.

Realización 4

- 45 Se sumergieron 10 kg de los tallos carnosos de *Cistanche tubulosa* (Schrenk.) Wight en forma de polvo en etanol al 40 % en una cantidad que era cuatro veces la del polvo durante 3 horas, y a continuación se cocieron a reflujo durante 3 horas. Después de esto, la mezcla cocida se filtró para obtener un primer filtrado, y mientras tanto el residuo de la mezcla cocida se mezcló con etanol al 40 % en una cantidad que era cuatro veces la del residuo, se coció durante cuatro horas y se filtró para obtener un segundo filtrado. Los procedimientos se repitieron otras dos veces para obtener un tercer filtrado y un cuarto filtrado. Los cuatro filtrados se combinaron y se concentraron al vacío hasta tener una gravedad específica de 1,05 (50 °C), dando como resultado de esa manera la producción de un extracto final que tenía un peso de 6,2 kg.

50 PURIFICACIÓN:

Realización 5

- 55 Se disolvieron 6 kg del extracto final en agua con calentamiento, que estaba en una cantidad de la mitad del extracto final. La solución de extracto se aplicó a continuación a una columna de adsorción empaquetada con resina de adsorción macroporosa pretratada de tipo D-101. La columna se eluyó en primer lugar con agua para producir un eluato de agua en una cantidad de dos veces la de los tallos carnosos, y se eluyó a continuación con etanol al 20 % para producir un primer eluato de etanol al 20 % en una cantidad de dos veces la de los tallos carnosos. El eluato de

agua se sometió a otra ronda de las operaciones de adsorción-desorción para obtener un segundo eluato de etanol. Los dos eluatos de etanol al 20 % se combinaron, se concentraron, y se secaron para producir una preparación que contenía glicósidos feniletanoides y tenía un peso de 865 g.

- 5 Se midieron los contenidos de equinacósido y acteósido mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), siendo la fase estacionaria silicosa de alquilsilano C18, siendo la fase móvil metanol-ácido acético al 0,15 % (30:70), con un caudal de 1 ml/min, y con una longitud de onda de detección de 333 nm.

El equinacósido y el acteósido se secaron a 60 °C al vacío durante 24 horas, se midieron y se disolvieron en metanol al 50 % para preparar las soluciones de referencia, conteniendo 0,1 mg del soluto cada solución de 1 ml.

- 10 La solución de ensayo se preparó por disolución de 50 mg de la preparación que contenía glicósidos feniletanoides en una cantidad apropiada de metanol al 50 % en un matraz aforado de 25 ml mientras se sonicaba. Se añadió más metanol al 50 % a la solución resultante hasta que se alcanzó la marca de 25 ml del recipiente. Se tomó la solución exactamente en una cantidad de 1 ml y se transfirió a un matraz aforado de 10 ml al que se añadió metanol al 50 % hasta la marca. La solución de ensayo se obtuvo después de filtrar la solución con una membrana de 0,45 µm.

- 15 La solución de referencia y la solución de ensayo se tomaron cada una en una cantidad de 5 µl y se inyectaron en la columna de cromatografía líquida, y se midieron las áreas de los picos del equinacósido y el acteósido. Se calcularon los contenidos usando las áreas de los picos. El contenido de equinacósido es un 37,5 % mientras que el contenido del acteósido es un 6,7 % en peso de la preparación.

Realización 6

- 20 Se disolvieron 6 kg del extracto final en agua con calentamiento, que estaba en una cantidad de cinco veces del extracto final. La solución de extracto se aplicó a continuación a una columna de adsorción empaquetada con resina de adsorción macroporosa pretratada de tipo AB-8. La columna se eluyó en primer lugar con agua para producir un eluato de agua en una cantidad de ocho veces la de los tallos carnosos, y se eluyó a continuación con etanol al 60 % para producir un primer eluato de etanol al 60 % en una cantidad de ocho veces la de los tallos carnosos. El eluato de agua se sometió a otra ronda de las operaciones de adsorción-desorción por elución de la columna con agua en una cantidad de seis veces la de los tallos carnosos y con etanol al 60 % en secuencia para obtener un segundo eluato de etanol en una cantidad de siete veces la de los tallos carnosos. Los dos eluatos de etanol al 60 % se combinaron, se concentraron, y se secaron para producir una preparación que contenía glicósidos feniletanoides y tenía un peso de 1203 g.

- 30 Mediante el uso del procedimiento de HPLC que se ha descrito en la Realización 5, se encontró que los contenidos de equinacósido y acteósido eran, respectivamente, un 48,6 % en peso, y un 11,8 % en peso de la preparación.

Realización 7

- 35 Se disolvieron 6 kg del extracto final en agua con calentamiento, que estaba en una cantidad de tres veces del extracto final. La solución de extracto se aplicó a continuación a una columna de adsorción empaquetada con resina de adsorción macroporosa de tipo AB-8. La columna se eluyó en primer lugar con agua para producir un eluato de agua en una cantidad de ocho veces la de los tallos carnosos, y se eluyó a continuación con etanol al 95 % para producir un primer eluato de etanol al 95 % en una cantidad de ocho veces la de los tallos carnosos. El eluato de agua se sometió a otra ronda de las operaciones de adsorción-desorción por elución de la columna con agua en una cantidad de seis veces la de los tallos carnosos y con etanol al 95 % en secuencia para obtener un segundo eluato de etanol en una cantidad de ocho veces la de los tallos carnosos. Los dos eluatos de etanol al 60 % se combinaron, se concentraron, y se secaron para producir una preparación que contenía glicósidos feniletanoides y tenía un peso de 1260 g.

Mediante el uso del procedimiento de HPLC que se ha descrito en la Realización 5, se encontró que los contenidos de equinacósido y acteósido eran, respectivamente, un 41,3 % en peso, y un 7,4 % en peso de la preparación.

Realización 8

- 45 Se disolvieron 6 kg del extracto final en agua con calentamiento, que estaba en la misma cantidad que el extracto final. La solución de extracto se aplicó a continuación a una columna de adsorción empaquetada con resina de adsorción macroporosa. La columna se eluyó en primer lugar con agua para producir un eluato de agua en una cantidad de cuatro veces la de los tallos carnosos, y se eluyó a continuación con etanol al 40 % para producir un primer eluato de etanol al 40 % en una cantidad de cinco veces la de los tallos carnosos. El eluato de agua se sometió a otra ronda de las operaciones de adsorción-desorción por elución de la columna con agua en una cantidad de tres veces la de los tallos carnosos y con etanol al 40 % en secuencia para obtener un segundo eluato de etanol en una cantidad de cuatro veces la de los tallos carnosos. Los dos eluatos de etanol al 40 % se combinaron, se concentraron, y se secaron para producir una preparación que contenía glicósidos feniletanoides y tenía un peso de 1107 g.

55

Mediante el uso del procedimiento de HPLC que se ha descrito en la Realización 5, se encontró que los contenidos de equinacósido y acteósido eran, respectivamente, un 31,7 % en peso, y un 6,1 % en peso de la preparación.

EFFECTOS FARMACOLÓGICOS:

Realización 9

- 5 La preparación medicinal de la presente invención se usó en un experimento de laberinto de agua para estudiar su efecto en la memoria de aprendizaje de ratones LACA. Se usaron comprimidos de Piracetam como fármaco comparativo positivo durante un ensayo de 6 días por semana. El ensayo duró 27 días. Los resultados se listan en la Tabla 2.

Tabla 2. Efecto en la memoria de aprendizaje de ratones por administración de la preparación de la presente invención por vía oral

Ensayo	Grupos de comparación	valor d (n = 27)					
		≥ 0,5		≥ 0,8		≥ suma 0,5	
		día	%	día	%	día	%
Primera ocasión	Grupo de control - Grupo provisto con 50 mg/kg de preparación que contenía glicósidos feniletanoides	4	14,8	5	18,5	9	33,3
	Grupo de control - Grupo provisto con 200 mg/kg de preparación que contenía glicósidos feniletanoides	10	37,0	3	11,1	13	48,2
Segundo ocasión	Grupo de control - Grupo provisto con 400 mg/kg de preparación que contenía glicósidos feniletanoides	0	0	27	100,0	27	100,0
	Grupo de control - Grupo comparativo positivo provisto con 400 mg/kg de Piracetam	5	18,5	2	7,4	7	25,5
	Grupo de Piracetam - Grupo provisto con 400 mg/kg de preparación que contenía glicósidos feniletanoides	7	25,9	16	59,3	23	85,2

- 10 De acuerdo con los datos que se listan en la Tabla 2, resulta evidente que la preparación de la presente invención tiene un efecto significativo en la memoria de aprendizaje de los ratones, como se ejemplifica mediante la diferencia en el tiempo de respuesta entre el grupo de control y los grupos dopados, que se doparon respectivamente con 50 mg/kg de la preparación que contenía glicósidos feniletanoides, 200 mg/kg de la preparación que contenía glicósidos feniletanoides, y 400 mg/kg de la preparación que contenía glicósidos feniletanoides. El período en el que el tiempo de respuesta muestra una diferencia significativa mediante el análisis del valor d para el grupo de 50 mg/kg es 9 días; para el grupo de 200 mg/kg es 13 días; y para el grupo de 400 mg/kg es 27 días. El período en el que el tiempo de respuesta muestra una diferencia significativa aumenta a medida que aumenta la dosificación. Además, el período en el que el tiempo de respuesta muestra una diferencia significativa para el grupo de control positivo (grupo de Piracetam) es 7 días, que es menor que el del grupo dopado de 400 mg/kg, y por lo tanto los comprimidos de Piracetam son menos eficaces en la memoria de aprendizaje de ratones en comparación con la preparación de la presente invención.

Realización 10

- 25 El efecto de la preparación de la presente invención en la prevención de la pérdida de memoria de ratones LACA se estudió mediante el experimento del laberinto de agua. Se administraron los fármacos por vía oral a los ratones. Una hora después de tal administración oral, se les proporcionó 0,1 ml de etanol al 30 %/10 g de BW. En 30 minutos, se inició el experimento del laberinto de agua. Los resultados del rendimiento de natación de los ratones se listan en la Tabla 3.

Tabla 3. Efecto de la preparación que contiene glicósidos feniletanoídeos administrados una semana por vía oral en la prevención de la pérdida de memoria de ratones correo LACA inducida por etanol

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales	Llegada a destino después de haberse entrenado		Llegada a destino después de haber proporcionado alcohol			
			Tiempo (segundos)	Número de errores/número de errores de animal	Tiempo (segundos)	Número de errores/número de errores de animal	Tasa de error, veces/número de animales	Tasa de error de grupo, veces/número de animales
Preparación de la presente invención	50	12	7,46 ± 0,13	0/0	34,40 ± 21,71*	47/8	5,88	3,92
	200	11	7,14 ± 0,18	0/0	16,99 ± 9,06##	8/3 ^{ΔΔ}	2,67	0,73
	400	10	7,91 ± 0,19	0/0	24,38 ± 27,84	46/7	6,57	4,60
Piracetam control	400	10	8,00 ± 0,46	0/0	24,08 ± 32,52	54/6	9,00	5,40
		12	7,73 ± 0,75	0/0	37,78 ± 15,90	62/10	6,20	5,17

Estudio t: comparación con el grupo comparativo ## P < 0,01, comparación con el grupo de 200 mg/kg * p < 0,05
 Estudio X²: comparación con grupo comparativo ΔΔ P < 0,01

De acuerdo con los datos que se listan en la Tabla 3, la preparación medicinal de la presente invención es más eficaz en la prevención de la pérdida de memoria de ratones cuando se compara con Piracetam. El tiempo de llegada del grupo provisto con la preparación de la presente invención es menor que el del grupo de Piracetam, después de que se haya proporcionado etanol a los ratones. La diferencia entre el grupo de 200 mg/kg de preparación y el grupo de control es $P < 0,01$. La diferencia entre el grupo de 50 mg/kg de preparación y el grupo de 200 mg/kg de preparación es $P < 0,05$. En consecuencia, la dosis de la preparación es un factor. No existe ninguna diferencia significativa entre el grupo de 400 mg/kg de preparación, el grupo de Piracetam, y el grupo de control, indicando de ese modo que la dosis de 200 mg/kg es la más eficaz en la prevención de la pérdida de memoria. Basándose en los datos de "error" que se listan en la Tabla 3, la dosis de 200 mg/kg es la más eficaz en la prevención de la pérdida de memoria.

Realización 11

Se realizó un estudio sobre el efecto de la preparación de la presente invención en la dificultad de la adquisición de memoria de autor es causada por Hiosina.

(1) fármaco y animal

El fármaco de ensayo y el fármaco comparativo fueron idénticos a los de la Realización 9. Los ratones se agruparon de forma aleatoria en el grupo comparativo normal, el grupo modelo, el grupo de 600 mg/kg de Piracetam, y los grupos de 400 mg/kg, 200 mg/kg, y 100 mg/kg de preparación. Cada grupo contiene 15 ratones. Los fármacos se administraron basándose en 0,2 ml/10 g de peso corporal. Se inició el entrenamiento de salto hasta completarse la administración en el día 29. El fármaco se administró una hora antes del entrenamiento. Con la excepción del grupo comparativo normal, se administró a cada grupo una inyección de Hiosina en la cavidad ventral en una cantidad de 1 mg/kg. El ensayo se realizó en el día 30, y se administró el fármaco una hora antes del entrenamiento. Los resultados se listan en la Tabla 4.

Tabla 4. Efecto de preparaciones que contiene glicósidos feniletanoides en la dificultad de adquisición de memoria de ratones causada por hiosina ($\bar{X} \pm SD$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales	Latencia de ensayo (S)	Frecuencia de error de ensayo (veces/5 min)
Grupo de control		14(1)	194,1 \pm 101,5*	1,36 \pm 1,45*
Grupo modelo		15	67,1 \pm 78,4	3,13 \pm 2,47
Grupo de Piracetam	600	15	144,5 \pm 117,4*	1,60 \pm 1,40*
Preparaciones de la presente invención	400	12(3)	206,1 \pm 98,8**	1,08 \pm 1,16**
	200	12(3)	183,2 \pm 115,2**	1,42 \pm 1,38*
	100	14(1)	191,8 \pm 117,5**	1,50 \pm 2,07

Comparación con el grupo modelo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; los valores entre paréntesis indican el número de muertes causadas por descarga eléctrica.

De acuerdo con los datos que se listan en la Tabla 4, los períodos de latencia de ensayo de los grupos se acortan cuando se comparan con el grupo comparativo normal. Sin embargo, la frecuencia de error de ensayo aumenta. Cuando se compara con el grupo modelo, el grupo de 600 mg/kg de Piracetam y los grupos de 400 mg/kg y 200 mg/kg de preparación tienen un período de latencia prolongado y una reducción en la frecuencia de error de ensayo, indicando de ese modo una mejora de la memoria. El grupo de 100 mg/kg de preparación tiene un período de latencia prolongada, y una frecuencia de error que no es diferente que la del grupo modelo.

Ejemplo de referencia 1

Se realizó un estudio sobre el efecto de la preparación de la presente invención en la trombosis de una derivación venosa en ratas.

Se estudiaron ratas SD macho en comparación con aspirina. Los resultados se listan en la Tabla 5.

Tasa de inhibición de trombosis (%) = (peso de trombosis del grupo comparativo de agua destilada - peso de trombosis del grupo de fármaco)/peso de trombosis del grupo comparativo de agua destilada \times 100 %.

Tabla 5. Efectos de la preparación que contiene glicósidos feniletanoides administrada por vía oral en la trombosis de derivación venosa en ratas

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales	Peso de trombosis (mg, $x \pm SD$)	Tasa de inhibición de trombosis (%)
Agua destilada		10	44,9 \pm 3,83	
Aspirina	100	10	29,2 \pm 4,00**	34,97
Preparación	200	10	37,7 \pm 7,42*	16,04
	100	10	36,1 \pm 5,16*	19,60
	50	10	42,6 \pm 7,12	5,12

Comparación con el grupo comparativo de agua destilada * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Basándose en los datos que se listan en la Tabla 5, las preparaciones de 200 mg/kg y 100 mg/kg fueron capaces de inhibir la trombosis de la derivación venosa de las ratas, cuando se comparan con el grupo comparativo de agua destilada, siendo las tasas de inhibición, respectivamente, 16,04 %, y 19,60 %. Sin embargo, los efectos de las preparaciones son más débiles que los de 100 mg/kg de aspirina que tiene una tasa de inhibición de un 34,97 %. La preparación de 50 mg/kg no tiene ningún efecto en la formación de trombosis.

Ejemplo de referencia 2

Se realizó un estudio sobre el efecto de la preparación de la presente invención en la agregación de plaquetas sanguíneas en ratas.

La agregación de plaquetas sanguíneas fue causada usando adenosin difosfato sódico (ADP). La solución de 1 mg/ml de ADP se mantuvo refrigerada antes de su uso. Poco antes de utilizar la solución de ADP, se diluyó tres veces con solución tampón de ácido fosfórico.

Las ratas SD macho se dividieron de forma aleatoria en cinco grupos de acuerdo con el peso corporal. Estos cinco grupos fueron el grupo comparativo de agua destilada, el grupo de aspirina, el grupo de 200 mg/kg de preparación, el grupo de 100 mg/kg de preparación, y el grupo de 50 mg/kg de preparación. Los fármacos se administraron por vía oral, siendo el volumen de administración 0,5 mg/100 g. Se administró agua destilada en la misma cantidad a las ratas del grupo comparativo de agua destilada. La administración continuó durante 7 días. Las ratas no se alimentaron durante 12 horas antes de la administración final. Una hora después de la administración final se extrajo sangre de la arteria principal. Se evitó la agregación de la sangre extraída de ese modo mediante citrato sódico al 3,8 % (1:9). La muestra de sangre se centrifugó a 1000 rpm durante tres minutos para facilitar la retirada del plasma rico en plaquetas sanguíneas (PRP). El resto de la muestra de sangre se centrifugó adicionalmente a 300 rpm durante 10 minutos para facilitar la separación del plasma pobre en plaquetas sanguíneas (PPP). Se introdujeron 200 μ l de PRP en un tubo de comparación por opacidad y la opacidad del mismo se ajustó al punto cero con PPP. La mezcla se incubó durante 5 minutos antes de añadir a la misma 50 μ l de la solución de ADP para causar la agregación de las plaquetas sanguíneas. El grado de agregación se determinó usando un medidor de agregación de plaquetas sanguíneas multifuncional SPA-4. La tasa de inhibición de la agregación de plaquetas sanguíneas se calcula mediante la siguiente fórmula.

tasa de inhibición (%) = (grado de agregación máximo del grupo de control - grado de agregación máximo del grupo experimental)/(grado de agregación máximo del grupo de control) x 100 %

Los resultados del ensayo se listan en la Tabla 6. Resulta evidente que las preparaciones (200 mg/kg, 100 mg/kg, 50 mg/kg) son capaces de inhibir la agregación de plaquetas sanguíneas, y que la preparación (200 mg/kg) tiene la tasa de inhibición más elevada de un 59,48 %.

Tabla 6. Efecto de la preparación que contiene glicósidos feniletanoides administrados por vía oral en la agregación de plaquetas sanguíneas de ratas

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de ratas	Agregación máxima (%) (* \pm SD)	Inhibición de agregación (%)
Grupo de agua destilada		10	54,82 \pm 7,88	
Grupo de aspirina	100	11	32,73 \pm 11,14**	40,30

(continuación)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de ratas	Agregación máxima (%) (* ± SD)	Inhibición de agregación (%)
Preparación	200	10	22,21 ± 6,23**	59,48
	100	11	34,54 ± 15,69*	36,99
	50	10	31,65 ± 12,81**	42,26

Comparación con el grupo de agua destilada * P < 0,01, ** P < 0,001.

REIVINDICACIONES

1. Una preparación medicinal que contiene glicósidos feniletanoides extraídos de *Cistanche tubulosa* (Schrenk.) Wight, comprendiendo dicha preparación un 25-70 % de equinacósido en peso de dicha preparación, y un 5-40 % de acteósido en peso de dicha preparación.
- 5 2. La preparación como se define en la reivindicación 1, que se extrae de tallos carnosos de *Cistanche tubulosa* (Schrenk.) Wight.
3. La preparación como se define en la reivindicación 1, que comprende además 2'-acetilacteósido; campneósido I; campneósido II; cistantubulósido A, B₁, B₂, C₁, C₂; crenatósido; decafeoilacteósido; isoacteósido; rodiolósido; siringalida A; 3'- α -L-ramnopiranósido, y tubulósido A, estando contenido cada uno en una cantidad menor de un 5 % en peso de dicha preparación.
- 10 4. Un procedimiento de fabricación de una preparación medicinal que contiene glicósidos feniletanoides, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas de:
- a) extraer tallos carnosos de *Cistanche tubulosa* (Schrenk.) Wight con un primer disolvente polar, en el que dicho primer disolvente polar es agua, o una mezcla de agua y etanol;
- 15 b) introducir el extracto resultante de la etapa a) en una columna que está empaquetada con perlas poliméricas macroporosas hidrofóbicas, permitiendo de ese modo que los glicósidos feniletanoides se adsorban en las perlas poliméricas;
- c) eluir la columna mediante el uso de un segundo disolvente polar que sirve como fase móvil, de modo que los compuestos que están adsorbidos con una fuerza relativamente menor se eluyan de la columna quedando aún adsorbidos la mayoría de los glicósidos feniletanoides sobre las perlas poliméricas, en el que dicho segundo disolvente polar es agua;
- 20 d) eluir la columna mediante el uso de un tercer disolvente polar de modo que se obtenga un eluato que contiene glicósidos feniletanoides, en el que dicho tercer disolvente polar es metanol, etanol, una mezcla de agua y metanol, o una mezcla de agua y etanol; y
- 25 e) retirar el disolvente que está contenido en el eluato de la etapa d), dando como resultado de ese modo la producción de una preparación que comprende un 25-70 % de equinacósido y un 5-40 % de acteósido en peso de dicha preparación.
5. El procedimiento como se define en la reivindicación 4, en el que dicha extracción en la etapa a) comprende mezclar los tallos carnosos de *Cistanche tubulosa* (Schrenk.) Wight con el primer disolvente polar, cocer la mezcla resultante durante 0,5-10 horas, y filtrar la mezcla cocida para obtener un extracto líquido o concentrar el líquido al vacío para obtener un extracto en forma concentrada.
- 30 6. El procedimiento como se define en la reivindicación 4, en el que las perlas poliméricas de la etapa b) son compuestos poliaromáticos reticulados.
7. El procedimiento como se define en la reivindicación 6, en el que las perlas poliméricas están formadas por poliestireno reticulado o copolímero de estireno y divinilbenceno reticulado.
- 35 8. El procedimiento como se define en la reivindicación 4, en el que el tercer disolvente polar es la mezcla de agua y etanol.
9. Composición medicinal para su uso en la prevención de demencia senil, comprendiendo dicha composición medicinal una cantidad terapéuticamente eficaz de la preparación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como principio activo, en una mezcla con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para el principio activo.
- 40 10. Uso de una preparación medicinal que contiene glicósidos feniletanoides extraídos de *Cistanche tubulosa* (Schrenk.) Wight en la preparación de un medicamento para la prevención y el tratamiento de una enfermedad de demencia senil en un paciente, comprendiendo dicha preparación un 10-70 % de equinacósido en peso de dicha preparación, y un 1-40 % de acteósido en peso de dicha preparación.
- 45 11. El uso como se define en la reivindicación 10, en el que dicha preparación comprende un 25-70 % de equinacósido en peso de dicha preparación, y un 5-40 % de acteósido en peso de dicha preparación.
12. El uso como se define en la reivindicación 10, en el que dicha preparación se extrae de tallos carnosos de *Cistanche tubulosa* (Schrenk.) Wight.
- 50 13. El uso como se define en la reivindicación 10, en el que dicha preparación comprende además 2'-acetilacteósido; campneósido I; campneósido II; cistantubulósido A, B₁, B₂, C₁, C₂; crenatósido; decafeoilacteósido; isoacteósido; rodiolósido; siringalida A; 3'- α -L-ramnopiranósido, y tubulósido A, estando contenido cada uno en una cantidad menor de un 5 % en peso de dicha preparación.