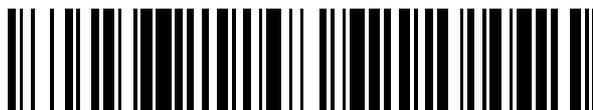


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 736**

51 Int. Cl.:

A61K 31/568 (2006.01)

A61K 36/58 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2010 E 10789761 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2444091**

54 Título: **Uso de toosendanina o extractos de Melia azedarach para la prevención o tratamiento de la demencia**

30 Prioridad:

19.06.2009 KR 20090054949

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

07.08.2014

73 Titular/es:

**ILDONG PHARM CO., LTD. (100.0%)
60 Yangjae-dong Seocho-gu
Seoul 137-733, KR**

72 Inventor/es:

**CHOI, JIN SUNG;
YOO, JONG SU;
YOU, YOUNG SANG;
KIM, YOUNG JAE;
PARK, EUN KYUNG;
RYU, JUNG SU;
YEON, SEUNG WOO y
KANG, JAE HOON**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 483 736 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de toosendanina o extractos de *Melia azedarach* para la prevención o tratamiento de la demencia.

5 **Campo técnico**

Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la Solicitud de Patente coreana Nº 10 – 2009 – 0054949, presentada el 19 de junio de 2009, que se incorpora en la presente como referencia para todos los efectos tal como se establece plenamente en la misma.

10 La presente invención se refiere al uso de toosendanina o de extractos de cinamomo (*Melia azedarach*, *Melia toosendan*) para la prevención o tratamiento de la demencia. Más particularmente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso en la prevención o tratamiento de la demencia que comprende toosendanina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

15 **Antecedentes de la técnica**

La demencia es un síndrome que avanza de forma gradual a largo plazo, un trastorno grave en la facultad de la memoria, concentración, lenguaje y reconocimiento debido al daño o pérdida de neuronas, dando como resultado la pérdida de la capacidad mental y actividad social. Una enfermedad representativa que causa demencia es la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer se divide en un tipo esporádico y un tipo familiar en función de su origen. El tipo esporádico de la enfermedad de Alzheimer, de origen desconocido, se produce en el 80 ~ 90 % o más de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer, y se produce principalmente en personas mayores (después de los 65 años). El otro tipo de la enfermedad de Alzheimer es causada principalmente por una mutación génica, tal como la proteína precursora amiloidea (de aquí en adelante denominada como PPA), y presenilina (PS) – 1 y 2, y siempre se produce en personas jóvenes (antes de los 65 años). Se considera que los síntomas del Alzheimer son causados principalmente por un beta amiloide (de aquí en adelante denominado como A β) que forma una placa senil fuera de las neuronas de los tejidos cerebrales, y una proteína Tau hiperfosforilada que forma un filamento helicoidal emparejado en las neuronas. Se reveló que el A β es una proteína formada por 40 – 42 aminoácidos, formada durante el metabolismo específico de la secuencia de aminoácidos de PPA mediante algunas proteasas, es decir, β – y γ – secretasas, causa neurotoxicidad, pérdida de sinapsis e inflamación por agregarse en sí misma (Cappari et al, Neurochem Res, 2008, 33: 526 – 532). Además, se comunicó que una proteína Tau desempeña un papel en el mantenimiento de la forma y estructura de una célula uniéndose a microtúbulos, y una proteína Tau hiperfosforilada se separa de los microtúbulos, destruye el microtúbulo, y forma ovillos neurofibrilares, induciendo a la muerte de las neuronas (Iqbal et al, Acta Neuropathol, 2009, publicado). Se sabe que el número de pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer es de aproximadamente 26 millones en todo el mundo (en 2008), y también se estima que el número alcance los 100 millones o más en 2050 debido al incremento de la población de edad avanzada (Carlsson, J Alz Dis, 2008, 15: 327 – 338). Sin embargo, se ha llevado a cabo muy lentamente el desarrollo de un agente terapéutico fundamental. Ejemplos de fármacos disponibles actualmente incluyen inhibidores de la actividad de la acetilcolinesterasa (por ejemplo, Aricept, Exelon, Reminyl) para fijar la concentración de acetilcolina (neurotransmisor relacionado con la memoria), y un antagonista del receptor NMDA (por ejemplo, Memantina) para inhibir una muerte celular neuronal causada por Ca²⁺. Sin embargo, estos únicamente se utilizan para disminuir el progreso de los síntomas. Por lo tanto, se requiere desarrollar con urgencia un agente terapéutico que muestre un efecto terapéutico fundamental.

45 El cinamomo (*Melia azedarach*, *Melia toosendan*) se clasifica en la familia Meliaceae y género *Melia*. Su velamen o corteza se denomina como *Meliae cortex* y su fruto se denomina como *Toosendan Fructus*. Se han utilizado principalmente como antihelmínticos desde la antigüedad (en China), y también muestran efectos antibacterianos, diuréticos, y antipiréticos. Asimismo, según las anotaciones en Donguibogam (Libro sobre medicina tradicional coreana), pueden utilizarse para el tratamiento de hernia escrotal (inflamación o dolor en el aparato reproductor / testículos, y trastorno urinario y fecal). Se comunicó que el efecto antihelmíntico de *Meliae cortex* o *Toosendan Fructus* de *Melia azedarach* se obtiene mediante la toosendanina basada en triterpenoide (o azedarachina, C₃₀H₃₈O₁₁, peso molecular 574, Wang and Yen, J Tradit Chin Med 1959, 262: 46 – 49) debido a que la toosendanina inhibe de forma selectiva la ingesta y la diferenciación de un insecto (Zhang et al, Acta Northwe Uni Agricult Sin, 1993, 21: 1 – 5). Aparte del cinamomo, la *Cedrela sinensis* se clasifica en la misma familia Meliaceae que contiene a la toosendanina. Su raíz / corteza del tallo es decir, *cedrelae cortex*, se utiliza como agentes antihelmínticos, antidiarreicos y terapéuticos para la shigelosis y la leucorrea.

60 Además, se comunicó que la toosendanina induce la diferenciación neuronal (Tang et al, Neurosci Res, 2003, 45: 225 – 231) y la apoptosis de células cancerígenas (Shi and Tang, Chin J Neurosci, 2004, 20: 461 – 462). También, existen patentes nacionales e internacionales relacionadas con el uso del cinamomo, incluyendo la citotoxicidad celular cancerígena (Patente coreana registrada Nº 10 – 0112032), un efecto de blanqueamiento y antiarrugas (Patente coreana registrada Nº 10 – 0345226, y la Patente estadounidense registrada Nº 06.866.856), un efecto insecticida (Patente coreana registrada Nº 10 – 0112657, y la Patente estadounidense registrada Nº 06.372.239), y un efecto de prevención de alergias (Patente coreana registrada Nº 10 – 0750879 B1). Se describe asimismo una composición para el tratamiento contra el cáncer, que contiene un extracto de hojas de *Melia*

azedarach L. (Solicitud de Patente EE.UU. Nº 4.563.496 A). No obstante, no hay ninguna investigación sobre el efecto de la toosendanina en la demencia.

Divulgación

5

Problema técnico

10

Los inventores de la presente invención investigaron un nuevo material para el tratamiento contra la demencia, y descubrieron que un extracto del fruto del cinamomo (es decir, Toosendan Fructus) que incluye toosendanina, y la toosendanina separada del extracto, facilita la producción de PPA α que muestra un efecto protector de la neurona a través del control del metabolismo de la PPA, e inhibe la producción de A β , mejorando, de este modo, la memoria en un modelo animal de demencia. Más tarde, se completó esta invención basándose en el hallazgo.

15

Por consiguiente, es objeto de la presente invención presentar el uso de toosendanina o su sal farmacéuticamente aceptable para la prevención o tratamiento de la demencia.

20

Otro objeto de la presente invención es presentar el uso de un extracto de cinamomo para la prevención o tratamiento de la demencia.

Solución técnica

25

Para conseguir un objeto de la presente invención, la presente invención presenta una composición farmacéutica para uso en la prevención o tratamiento de la demencia, comprendiendo toosendanina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como ingrediente activo.

30

Para conseguir otro objeto de la presente invención, la presente invención presenta un uso de toosendanina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para la preparación de un agente para prevenir o tratar la demencia.

35

Para conseguir otro objeto de la presente invención, la presente invención presenta una composición farmacéutica para uso en la prevención o tratamiento de la demencia, comprendiendo extracto de cinamomo (*Melia azedarach* o *Melia toosendan*) como ingrediente activo.

40

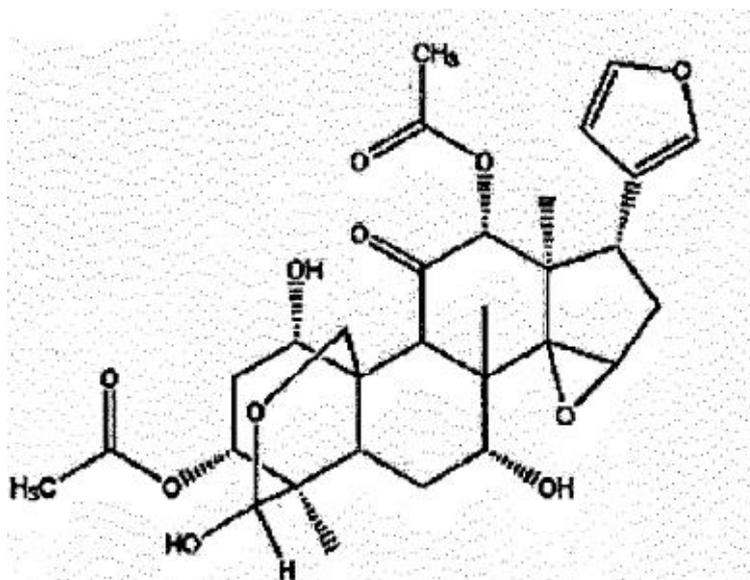
Para conseguir otro objeto de la presente invención, la presente invención presenta un uso del extracto de cinamomo (*Melia azedarach* o *Melia toosendan*) para la preparación y tratamiento de la demencia.

De aquí en adelante, la presente invención se describirá con detalle.

45

La toosendanina utilizada en la presente invención representada por la fórmula 1, es conocida por mostrar un efecto insecticida, una citotoxicidad de células cancerígenas, y efectos de blanqueamiento y antiarrugas, y muestra además un efecto de prevención / tratamiento de la demencia. Por primera vez, se ha dado a conocer en la presente invención el efecto de la toosendanina.

[Fórmula 1]



C₃₀H₃₈O₁₁ (peso molecular 574,62)

5 La demencia representa una enfermedad que provoca una disfunción cognitiva adquirida y cambios de personalidad, a pesar del nivel intelectual normal en el periodo de crecimiento. En la demencia, el nervio craneal es destruido por diversas causas provocando trastornos en general en las funciones mentales, tales como trastorno de la memoria, trastorno del lenguaje, incontinencia urinaria / fecal, paranoia y afasia. Es más, el progreso de la demencia puede estar acompañado por síntomas psicológicos como melancolía, trastorno de la personalidad y agresión. En el ámbito médico, el envejecimiento y la herencia se han puesto de relieve como las causas de la demencia. Sin embargo, aún no se ha descubierto una causa exacta de la enfermedad y método de tratamiento. Las enfermedades clasificadas en la demencia incluyen, pero no se limitan a, demencia de Alzheimer, demencia cerebrovascular, demencia senil, y demencia por lesiones cerebrales.

15 La composición para utilización según la presente invención comprende toosendanina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como ingrediente activo que puede comprender cualquier extracto siempre que el extracto comprenda toosendanina como ingrediente activo. Por ejemplo, el extracto puede ser un extracto de *Cedrela sinensis* o extracto de cinamomo, aunque la presente invención no se limita a los mismos. Preferiblemente, puede ser un extracto de cinamomo (*Melia azedarach* o *Melia toosendan*), y más preferiblemente puede ser un extracto de toosendan fructus (fruto del cinamomo) o *Meliae cortex* (velamen o corteza de cinamomo). Las dos especies de cinamomo (*Melia azedarach* y *Melia toosendan*) se clasifican en la familia *Meliaceae* y en el género *Melia*. Su velamen o corteza (denominada como *Meliae cortex*) y su fruto (*Toosendan Fructus*) se han utilizado principalmente como antihelmínticos desde la antigüedad (en China), también muestran efectos antibacterianos, diuréticos y antipiréticos. Asimismo, según las anotaciones en *Donguibogam*, pueden utilizarse para el tratamiento de la hernia escrotal (inflamación o dolor en el aparato reproductor / testículos, y trastorno urinario y fecal). El extracto de cinamomo (*Melia azedarach* o *Melia toosendan*) de la presente invención puede ser extraído y preparado a partir de cualquier parte del cinamomo, tal como frutos, hojas, tallos, raíces, y preferiblemente puede prepararse a partir de frutos, cortezas de raíz o cortezas de tallo.

30 El extracto utilizado de cinamomo (*Melia azedarach* o *Melia toosendan*) de la presente invención puede prepararse mediante un método de extracción conocido en la materia. Como disolvente de extracción, por ejemplo, puede utilizarse cualquier disolvente seleccionado de agua, del grupo que incluye disolventes orgánicos tales como alcohol C1 a C6 como etanol (alcohol etílico), metanol, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, n – hexano, dietiléter, acetona, benceno, o un disolvente mezclado de los mismos. Preferiblemente, pueden utilizarse para la extracción agua o alcohol C1 a C6. Cuando se utilice el método de extracción de disolvente para la preparación de un extracto, pueden utilizarse la extracción con agua caliente, la extracción ultrasónica, y la extracción de reflujo. Más preferiblemente, el extracto de cinamomo utilizado en la presente invención puede ser extraído o preparado utilizando metanol como disolvente. La proporción de cinamomo y metanol en la extracción no está particularmente limitada, aunque el metanol puede añadirse al cinamomo en una cantidad de 3 ~ 15 veces respecto al peso del cinamomo. Preferiblemente, para aumentar la eficiencia de la extracción, el metanol puede añadirse al cinamomo en una cantidad de 5 ~ 10 veces respecto al peso del cinamomo. La temperatura de extracción puede oscilar preferiblemente entre 10 - 30 °C bajo presión atmosférica. Asimismo, el tiempo de extracción puede variar según la temperatura de extracción, pero puede oscilar entre 48 – 96 horas, y preferiblemente puede ser 72 horas. Cuando el tiempo de extracción sea corto, la extracción de un componente de cinamomo es insuficiente. Por otro lado, cuando el tiempo de extracción sea demasiado largo, el rendimiento de extracción es reducido por la evaporación. También, con el fin de aumentar la eficiencia de la extracción, preferiblemente, el cinamomo puede molerse mediante un molino, y el paso de extracción de metanol puede repetirse dos veces para extraer adicionalmente un componente residual.

50 El extracto extraído por metanol puede fraccionarse mediante un método conocido en la materia para eliminar las impurezas y aumentar la concentración de un ingrediente activo. Con el fin de aumentar la eficacia del fraccionamiento, el extracto puede concentrarse al vacío. Como disolvente para el fraccionamiento, se puede utilizar cualquiera del grupo que incluye disolventes tal como alcohol C1 a C6, tales como etanol y metanol, acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, n – hexano, dietiléter, acetona, benceno, o un disolvente mezclado de los mismos. Preferiblemente, el acetato de etilo puede ser utilizado para el fraccionamiento. Una fracción puede utilizarse tal como está, o puede volverse a fraccionar. En el refraccionamiento, preferiblemente, puede utilizarse un disolvente mezclado con agua, metanol y n – hexano.

60 En un ejemplo de la presente invención, el toosendan fructus molido en pequeños trozos se extrajo dos veces en metanol en un volumen 5 veces mayor con respecto al peso del toosendan fructus durante 3 días, y se filtró un extracto, se concentró al vacío, se suspendió en agua, y se trató con acetato de etilo en el mismo volumen. A continuación, se recogió una fracción de acetato de etilo y se concentró al vacío. La fracción concentrada se añadió con metanol y n – hexano al 90 ~ 95 % en el mismo volumen, después se agitó. Mas tarde, se recogió una fracción de metanol, se concentró al vacío, y se obtuvo un extracto final (Véase el Ejemplo 1).

65 La toosendanina utilizada en la presente invención puede separarse / purificarse a partir de material natural, disponible en el mercado, o preparado por un método de síntesis química conocido en la materia.

Preferiblemente, la toosendanina utilizada en la presente invención puede separarse / purificarse a partir de un material natural. Más preferiblemente, puede separarse / purificarse a partir de *Melia toosendan*, y aún más preferiblemente, puede separarse / purificarse a partir del toosendan fructus (fruto del cinamomo) o Meliae cortex (corteza de una raíz o tallo de *Melia toosendan*). Un método para obtener un extracto que contiene toosendanina de *Melia toosendan* es el mismo que el descrito anteriormente. La separación de la toosendanina del extracto puede llevarse a cabo según el método de separación cromatográfica conocido en la materia. Por ejemplo, durante el fraccionamiento utilizando la cromatografía en columna de sílice, y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), puede purificarse un ingrediente activo.

En un ejemplo de la presente invención, el extracto de cinamomo (*Melia azedarach* o *Melia toosendan*) se fraccionó en 8 partes por la malla 60 de resina de sílice mientras se aumentó de forma gradual la proporción de la mezcla (del 100 % de diclorometano: 0 % de metanol a 0 % de diclorometano: 100 % de metanol). Se obtuvieron entonces las fracciones. Después, se fraccionó una parte con la actividad más alta (diclorometano: metanol = 25: 1) a través de la resina de sílice octadecilsililado mientras se varió la concentración de metanol. Se aseguró entonces una fracción con la actividad más alta, y se volvió a fraccionar en las mismas condiciones cambiando la concentración de metanol. Se aseguró una fracción con la actividad más alta, y durante el fraccionamiento de la HPLC, se purificó la toosendanina (Véase el Ejemplo 2). La fracción final se identificó como toosendanina a través de un análisis de espectroscopia de RMN y una espectrometría de masas.

La toosendanina como ingrediente activo en la composición para utilización según la presente invención o el extracto de cinamomo (*Melia azedarach* o *Melia toosendan*) inhibe la actividad de la β - secretasa, y favorece la actividad de la α - secretasa. Por último, tiene una actividad inhibitoria de la producción de beta amiloide. Esto lo descubrieron por primera vez los inventores de la presente invención.

La enfermedad de Alzheimer es causada principalmente por $A\beta$ y una proteína Tau, formando una placa senil y una fibra nerviosa externa e interna, respectivamente, de las neuronas. Esto provoca la atrofia de un tejido cerebral, y el trastorno de la memoria. Entre la $A\beta$ y la Tau, la $A\beta$ está estrechamente relacionada con la muerte directa de una neurona. En la enfermedad de Alzheimer, se supone que la activación en la vía de producción de la PPA a $A\beta$ induce un síntoma inicial debido a alguna razón, y una proteína Tau está relacionada con la aceleración de la enfermedad (Small and Duff, Neuron, 2008, 5: 591 - 598). En consecuencia, se cree que para la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en primer lugar, es importante el bloqueo de la vía de producción de $A\beta$. La PPA se escinde en el fragmento C - terminal β (CTF β) que incluye una secuencia de aminoácidos de PPA β y $A\beta$ mediante la β - secretasa, y después se forman durante la acción de la γ - secretasa en el CTF β , AICD (dominio intracelular de la PPA), y $A\beta$. De este modo, la inhibición de la actividad de la β - secretasa puede ser un método para la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Asimismo, la α - secretasa descompone de manera competitiva la PPA con respecto a la β - secretasa, inhibiendo, de este modo, la producción de $A\beta$. Mediante la α - secretasa, se induce la producción de la PPA α (uno de los metabolitos de la PPA). Así, la mejora de la actividad de la α - secretasa puede ser otro método para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer.

La composición para utilización según la presente invención o toosendanina como ingrediente activo en la composición para utilización según la presente invención es un inhibidor de la producción de $A\beta$ que bloquea de manera efectiva la vía de producción de $A\beta$, y favorece la producción de la PPA α que muestra un efecto protector de la neurona, correspondiente al objeto descrito anteriormente sobre el desarrollo de un agente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En un Ejemplo de la presente invención, se descubrió que durante un experimento celular por Western Blot, el extracto de cinamomo o toosendanina en la composición para utilización según la presente invención favorece la producción de PPA α , e inhibe la producción de PPA β (véase el Ejemplo 5 - 1), y también, se descubrió que durante el experimento celular por un kit de análisis cuantitativo beta amiloide, estos inhibían la producción de beta amiloide (véase el Ejemplo 5 - 2).

En un Ejemplo de la presente invención, se descubrió que durante un experimento animal por un kit de análisis cuantitativo beta amiloide, el extracto de cinamomo o toosendanina en la composición para utilización según la presente invención reduce el nivel de beta amiloide en un modelo animal de demencia (Véase el Ejemplo 8).

En un Ejemplo de la presente invención, se descubrió que el extracto de cinamomo o toosendanina en la composición para utilización según la presente invención, trata la memoria / disfunción cognitiva (uno de los principales síntomas de la demencia) en un modelo animal de demencia durante una prueba del laberinto en Y, una prueba del laberinto de agua, y una prueba de evitación pasiva en una rata inducida con demencia que es administrada con la composición para utilización según la presente invención (Véase el Ejemplo 7).

En consecuencia, se determinó que la composición para utilización según la presente invención muestra un efecto significativo en la prevención o tratamiento de la demencia mientras se bloquea de manera efectiva una vía de producción de $A\beta$ y se promueve la producción de PPA α que muestra un efecto protector de una neurona.

En otro Ejemplo de la presente invención, utilizando alcohol etílico (etanol) con diversas concentraciones como un disolvente de extracción, se obtuvo el extracto de cinamomo en la composición para utilización según la presente invención, y la toxicidad y eficacia de los respectivos extractos se compararon entre sí. Como resultado, cuando se extrajo el extracto de cinamomo utilizado en la presente invención mediante alcohol etílico como disolvente de extracción, por lo general muestra una elevada eficacia independientemente de la concentración de alcohol etílico. En especial, cuando el contenido de alcohol etílico de un disolvente de extracción se ajustó del 30 % al 50 %, se determinó que es posible asegurar el extracto de cinamomo utilizado de la presente invención con una elevada eficacia y una toxicidad muy baja (Véase el Ejemplo 9).

De este modo, la presente invención presenta una composición farmacéutica para utilización en la prevención o tratamiento de la demencia, comprendiendo toosendanina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como ingrediente activo. Además, la presente invención presenta una composición farmacéutica para utilización en la prevención o tratamiento de la demencia, comprendiendo extracto de cinamomo (Melia azedarach o Melia toosendan) como ingrediente activo. Una composición farmacéutica para utilización según la presente invención puede comprender entre 0,001 a 99,999 % en peso del extracto de cinamomo (Melia azedarach o Melia toosendan) o toosendanina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y el resto puede ser un portador farmacéuticamente aceptable.

La toosendanina utilizada en la presente invención puede utilizarse sola o en forma de sal farmacéuticamente aceptable. Tal y como se utiliza en la presente, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a que los componentes presentes en la composición son fisiológicamente aceptables y por lo general no provocan reacciones alérgicas o similares cuando se administran a seres humanos. Preferiblemente, la sal puede ser una sal de adición de ácido formada a partir de un ácido libre farmacéuticamente aceptable. El ácido libre puede ser un ácido orgánico o inorgánico. El ácido orgánico incluye pero no se limita al ácido cítrico, ácido acético, ácido láctico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido oxálico, ácido trifluoroacético, ácido benzoico, ácido glucónico, ácido metanosulfónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido 4 – toluensulfónico, ácido glutámico y ácido aspártico. El ácido inorgánico incluye pero no se limita al ácido clorhídrico, ácido bromico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico.

Una composición farmacéutica para utilización según la presente invención puede comprender toosendanina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o extracto único de cinamomo (Melia azedarach o Melia toosendan) o comprender además portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Tal y como se utiliza en la presente, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a que los componentes presentes en la composición no tienen una composición tóxica fisiológicamente aceptable y en general no provoca reacciones alérgicas como trastornos gastrointestinales, mareos o reacciones similares cuando se administra a seres humanos.

Puede comprenderse un portador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, portadores para las preparaciones parenterales u orales. Los portadores para las preparaciones orales pueden comprender lactosa, almidón, derivados de celulosa, estereato de magnesio, y ácido esteárico. Además, pueden comprender diversos materiales de distribución de fármacos para la administración de agentes peptídicos. Los portadores para las preparaciones parenterales pueden comprender agua, aceite apropiado, solución salina, glucosa acuosa y glicol. Además pueden comprender estabilizadores y conservantes. Ejemplos de estabilizadores pueden ser antioxidantes tales como sulfito de hidrógeno sódico, sulfito sódico, y ácido ascórbico. Ejemplos de conservantes pueden ser cloruro de benzalconio, metil – o propil – parabeno, y clorobutanol. Una composición farmacéutica para utilización según la presente invención puede además comprender lubricantes, agentes humectantes, agentes edulcorantes, sazonadores, agentes emulsionantes y agentes de suspensión. El listado de portadores farmacéuticamente aceptables se describe en *Sciences Pharmaceutical* de Remington, 19ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995.

Una composición farmacéutica para utilización según la presente invención que comprende extracto de cinamomo (Melia azedarach o Melia toosendan), toosendanina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como ingrediente activo, puede comprender una cantidad eficaz de extracto de cinamomo (Melia azedarach o Melia toosendan), toosendanina o únicamente sal farmacéuticamente aceptable de la misma o además comprender portadores farmacéuticamente aceptables. Tal y como se utiliza en la presente, "cantidad farmacéuticamente aceptable" se refiere a la cantidad que muestra más reacción que el control negativo y preferiblemente, se refiere a la cantidad suficiente para tratar o prevenir la demencia. Tal y como se utiliza en la presente, la demencia puede ser enfermedad de Alzheimer, demencia cerebrovascular, demencia senil y demencia causada por una lesión cerebral.

Una composición para utilización según la presente invención puede administrarse a mamíferos así como a humanos por diversas vías. Por ejemplo, puede ser administrada de forma oral o de forma parenteral. Para la administración parenteral, puede administrarse por, pero no se limita a las mismas, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intraósea, subdural, intracardiaca, intracutánea, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, tracto gastrointestinal, parenteral, sublingual o rectal.

Una composición farmacéutica para utilización según la presente invención puede prepararse en una formulación para la administración oral o la administración parenteral, tal y como se ha descrito anteriormente.

5 En el caso de la formulación para la administración oral, la composición para utilización según la presente invención puede formularse en polvos, gránulos, comprimidos, píldoras, y comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, y emulsiones utilizando el método conocido en la materia. Por ejemplo, los comprimidos o los comprimidos recubiertos de azúcar pueden prepararse mezclando un ingrediente activo con un excipiente sólido, moliendo, y añadiendo después un adyuvante apropiado. Ejemplos de excipientes apropiados, pueden comprender azúcares que comprenden lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol y maltitol, almidones que comprenden almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz y almidón de patata, celulosas que comprenden celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio e hidroxipropilmetilcelulosa, y rellenos que comprenden gelatina y polivinilpirrolidona. Si se desea, puede comprender como espesante polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido alginico o alginato de sodio. Además, la composición farmacéutica para utilización según la presente invención puede comprender un agente anticoagulante, un lubricante, agentes humectantes, saborizantes, agentes emulsionantes y antisépticos.

20 En el caso de las preparaciones parenterales, estas comprenden inyecciones, cremas, lociones, ungüentos, aceites, humectantes, geles, y aerosoles. La formulación de los mencionados anteriormente está bien descrita en *Science Pharmaceutical* de Remington, 15ª edición, 1975.

25 La cantidad efectiva total de composición farmacéutica para utilización según la presente invención puede administrarse a un sujeto como una única dosis, o puede administrarse utilizando un protocolo de tratamiento fraccionado, en el que se administran múltiples dosis durante un periodo más prolongado. La composición farmacéutica para utilización según la presente invención puede variar en la cantidad del componente eficaz dependiendo de la gravedad y / u objeto de la enfermedad, pero preferiblemente, puede administrarse entre 0,01 µg / kg a 500 mg / kg, y más preferiblemente 0,1 µg / kg a 100 mg / kg por día. Sin embargo, un experto en la materia sabría que la concentración de toosendanina o extracto de cinamomo (*Melia azedarach* o *Melia toosendan*) para obtener una dosis eficaz en un sujeto depende de diversos factores incluyendo la edad, el peso corporal, el estado de salud, la gravedad de la enfermedad, la dieta y excreción del sujeto, la vía de administración, el número de tratamientos a administrar, etc. En vista de estos factores, cualquier experto en la materia puede determinar la dosis eficaz adecuada de toosendanina o extracto de cinamomo (*Melia azedarach* o *Melia toosendan*) para prevenir o inhibir la demencia. No se impone ninguna limitación particular a la formulación, vía de administración y modo de administración de la composición farmacéutica para utilización según la presente invención, siempre y cuando la composición muestre los efectos de la presente invención.

35 La presente invención presenta un uso de la toosendanina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para la preparación de un agente para prevenir o tratar la demencia.

40 La presente invención presenta un uso de extracto de cinamomo (*Melia azedarach* o *Melia toosendan*) para la preparación de un agente para prevenir o tratar la demencia.

Para la prevención o tratamiento de la demencia, se administra una cantidad eficaz de toosendanina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma a un sujeto que lo necesite.

45 Para la prevención o tratamiento de la demencia, se administra una cantidad eficaz de extracto de cinamomo (*Melia azedarach* o *Melia toosendan*) a un sujeto que lo necesite.

50 La toosendanina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma, el extracto de cinamomo (*Melia azedarach* o *Melia toosendan*) utilizados en la presente invención pueden administrarse con una cantidad eficaz por diversas vías que incluyen la vía oral, intracutánea, subcutánea, intravenosa, o intramuscular. Tal y como se utiliza en la presente, la "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad eficaz en el tratamiento de la demencia cuando se administra a un paciente.

55 Tal y como se utiliza en la presente, el "sujeto" se refiere a mamíferos, en particular, animales incluyendo a los humanos y puede ser una célula, un tejido u órgano originado del animal. El sujeto puede ser un paciente que necesita tratamiento.

60 La toosendanina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma, el extracto de cinamomo (*Melia azedarach* o *Melia toosendan*) utilizados en la presente invención pueden administrarse solos o mediante diversas formulaciones que se han mencionado anteriormente, y preferiblemente pueden administrarse hasta que se deduzca el efecto en la demencia.

Efectos ventajosos

65 De ese modo, la composición farmacéutica para utilización según la presente invención que incluye el extracto de cinamomo, toosendanina, o su sal farmacéuticamente aceptable, como ingrediente activo, es muy eficaz

en la prevención o tratamiento de la demencia. En especial, la composición, para utilización según la presente invención, es eficaz en la inhibición de la producción de A β y en la inducción de la mejora de la producción de PPA α que muestra un efecto protector de una neurona. Por lo tanto, es muy eficaz en la prevención o tratamiento de la demencia como la enfermedad de Alzheimer. Así, la composición farmacéutica para utilización según la presente invención que incluye extracto de cinamomo, o toosendanina, como ingrediente activo, puede utilizarse en varios ámbitos tales como la preparación de fármacos preventivos / de tratamiento para pacientes con demencia o personas de edades susceptibles a la demencia.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama que muestra un proceso para obtener toosendanina según la presente invención, un extracto de toosendan fructus y una fracción que incluye toosendanina;

La Figura 2 muestra el resultado de la medición del efecto en la producción de PPA α y PPA β (metabolitos de PPA) mediante la toosendanina, y extractos de toosendan fructus del respectivo disolvente orgánico que incluye toosendanina, en el que la medición se llevó a cabo mediante Western Blot (control, c: un grupo de control no tratado con un extracto; MeOH: un grupo tratado con un extracto de metanol de toosendan fructus);

La Figura 3 muestra el resultado de la medición del efecto en la producción de PPA β (metabolitos de PPA) por extractos de meliae cortex, en el que la medición se llevó a cabo por Western Blot (EtOH: un grupo tratado con extracto de etanol de meliae cortex; MeOH: un grupo tratado con extracto de metanol de meliae cortex; AE: un grupo tratado con un extracto de acetato de etilo de meliae cortex; hexano: un grupo tratado con extracto de n – hexano de meliae cortex; y C: un grupo de control no tratado con extracto alguno);

La Figura 4 muestra un gráfico de un resultado de la medición de la cantidad de A β 40 cuando una línea celular CHO sobreexpresa BACE1 y la mutación sueca de PPA695 se trató con extracto de alcohol etílico de toosendan fructus, en el que la medición se llevó a cabo por un kit de análisis cuantitativo A β 40 para determinar si se inhibió la producción de A β 40;

La Figura 5 muestra un gráfico de una medición comparativa del comportamiento de alternancia espontánea (%) en una prueba del laberinto en Y de una rata con demencia, en el que la medición se llevó a cabo para determinar el efecto del extracto de alcohol etílico de toosendan fructus en la mejora de la memoria (% de alternancia: comportamiento de alternancia (%); vehículo: un grupo de control administrado con sólo el 10 % de Labrasol sin extracto alguno; y toosendan fructus: un grupo administrado con extracto de alcohol etílico de toosendan fructus);

La Figura 6 muestra un gráfico de un resultado de una medición comparativa del tiempo requerido para hallar una plataforma en la prueba del laberinto de agua de una rata con demencia, en el que la medición se llevó a cabo para determinar el efecto del extracto de alcohol etílico de toosendan fructus en la mejora de la memoria (Tiempo de latencia de escape (s): tiempo necesario para hallar una (s) plataforma (s); vehículo: un grupo de control administrado con sólo el 10 % de Labrasol sin extracto alguno; y toosendan fructus: un grupo administrado con extracto de alcohol etílico de toosendan fructus);

La Figura 7 muestra un gráfico del resultado de la medición del tiempo requerido para entrar en una habitación oscura en una prueba de evitación pasiva de una rata con demencia, en el que la medición se llevó a cabo para determinar el efecto del extracto de alcohol etílico de toosendan fructus en la mejora de la memoria (Tiempo de latencia de escape (s): tiempo necesario para entrar en una (s) habitación (es) oscura (s); vehículo: un grupo de control administrado con sólo el 10 % de Labrasol sin extracto alguno; y toosendan fructus: un grupo administrado con extracto de alcohol etílico de toosendan fructus);

La Figura 8 muestra un gráfico del resultado de la medición de la cantidad de A β 40 en un tejido cerebral de una rata, en el que la medición se llevó a cabo por un kit de análisis cuantitativo A β 40 para determinar si se inhibió la producción del extracto de alcohol etílico de toosendan fructus en el tejido cerebral de una rata con demencia;

La Figura 9 muestra un gráfico del resultado de la medición de la cantidad de A β 40 en un suero de rata en el que la medición se llevó a cabo por un kit de análisis cuantitativo A β 40 para determinar si se inhibió la producción de A β 40 en la sangre de la rata administrada con toosendanina (Vehículo: un grupo de control administrado con sólo el 20 % de alcohol etílico sin toosendanina; y 5 mg / kg, 50 mg / kg; grupos experimentales administrados con toosendanina en una dosis de 5 mg / kg, y 50 mg / kg, respectivamente;

La Figura 10 muestra una fotografía de un resultado comparativo de los cambios en la eficacia de la composición para la inhibición de la producción de PPA β o para favorecer la producción de PPA α , según los disolventes de extracción, en el que el resultado se midió por Western Blot (100 % alcohol etílico a 30 % alcohol etílico: un grupo administrado con extracto de cinamomo extraído mediante un disolvente mezclado con agua y alcohol etílico de proporciones respectivas (%); y C: un grupo de control no tratado con extractos); y

La Figura 11 muestra un gráfico de un resultado de los cambios en la eficacia de la composición para la inhibición de la producción de A β , según los disolventes de extracción (100 % alcohol etílico a 50 % alcohol etílico: un grupo administrado con extracto de cinamomo extraído mediante un disolvente mezclado con agua y alcohol etílico de proporciones respectivas (%)).

Modo de la invención

A continuación, la presente invención se describirá detalladamente en referencia a los Ejemplos.

Sin embargo, los siguientes Ejemplos ilustran la invención y no pretenden limitar la misma.

<Ejemplo 1>**Extracción y fraccionamiento de toosendan fructus y meliae cortex**

5 Se sumergió toosendan fructus finamente molido (peso seco: 10 kg) en 50 L de metanol durante 3 días para su extracción. Este paso se repitió dos veces. A continuación, se recogió el extracto, se filtró y se concentró al vacío. El concentrado obtenido se añadió a 10 L de agua, se suspendió y se añadió al mismo volumen de acetato de etilo, se mezcló y se dejó reposar. A continuación, se recogió una fracción de disolvente de acetato de etilo y se concentró al vacío. Para otras fracciones del concentrado de acetato de etilo, se añadieron a este 10 L de metanol al 90 ~ 95 % (5 ~ 10 % de agua) y 10 L de n – hexano y, después, se mezcló y dejó reposar. A continuación, se recogió una fracción de metanol al 90 ~ 95 % y se concentró al vacío. Las fracciones respectivas obtenidas en las etapas de extracción y fraccionamiento se emplearon para el análisis de la actividad y se conservaron a 4 °C hasta que se separaron sus ingredientes activos. También se extrajo meliae cortex mediante el mismo método y se obtuvieron los mismos extractos de disolvente respectivos.

<Ejemplo 2>**Separación de un ingrediente activo de subfracción de toosendan fructus**

20 Desde el concentrado de la fracción de metanol 90 ~ 95% obtenido en el Ejemplo 1, un ingrediente activo se separó. El concentrado se fraccionó en 8 subfracciones de resina de sílice (malla 60), mientras que la proporción de mezcla de metanol se incrementó gradualmente (del 100 % de diclorometano: 0 % de metanol al 0 % de diclorometano: 100 % metanol). De estas, se obtuvieron 3 fracciones con actividad (diclorometano: Metanol = 25: 1, 10: 1 5: 1). El concentrado de la fracción de 25: 1 con la actividad más alta se fraccionó a través de resina de sílice octadecilsililado (Biotage FLASH + TM, C18HS 25 + M, 60Å, 40 – 63 µm, FPK0 – 1107 - 16046, 10 ml / min) mientras que la concentración de MeOH se incrementó del 15% al 100% por etapas. Después del examen de las actividades, se obtuvo una fracción activa del 35 % al 50 %. Esta fracción activa se refraccionó en las mismas condiciones cambiando la concentración (30 ~ 100 %) de MeOH. A continuación, se obtuvo una fracción activa (40 ~ 60 %) y se concentró. A partir del concentrado, se purificó un ingrediente activo mediante el uso de un disolvente mixto de acetonitrilo y agua como disolvente de separación (acetonitrilo 48 %), a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando una resina de sílice octadecilsililado (Pack YMC ODS - A, 150 x 10 mm i.d., 120Å, S – 5 µm, AA12S05 - 1510WT) a una velocidad de flujo de 4 ml / min (véase la Figura 1).

35 El ingrediente activo purificado se identificó como toosendanina, representado por la Fórmula 1 a través del análisis estructural y la determinación del peso molecular mediante el uso de un análisis de espectroscopia de RMN y una espectrometría de masas.

<Ejemplo 3>**Medición del contenido de toosendanina en un extracto de alcohol etílico de fructus toosendan**

40 Con el fin de llevar a cabo una prueba de eficacia de un extracto de alcohol etílico, se midió el contenido de toosendanina (como un indicador / ingrediente activo) en el extracto de alcohol etílico. Se analizó Toosendanina utilizando un 30 % de acetonitrilo que contenía 0,05 % de TFA (ácido trifluoroacético) como disolvente de elución, mediante HPLC utilizando resina de sílice octadecilsililado (Pack YMC ODS - A, 150 x 10 mm i.d., S – 5 µm) como columna, a una velocidad de flujo de 1 ml / min a 214 nm. El material de referencia de toosendanina comprado se diluyó hasta una concentración apropiada, y el valor del área se midió según una concentración. En base a esto, se realizó una curva de calibración absoluta de la proporción área - concentración en un cromatograma del material de referencia y se determinó que la linealidad era de 0,999. A continuación, se utilizó la curva para la cuantificación. Toosendanina existe naturalmente en forma de isómeros y, por lo tanto, se detectó (después de 15,7 minutos y 20,6 minutos, respectivamente) en la condición de análisis descrita anteriormente. Para una cuantificación más exacta, se suspendió un extracto de etanol de toosendan fructus en agua destilada, se fraccionó en disolvente mediante acetato de etilo, y se concentró. El concentrado se utilizó para el análisis. Cuando se llevó a cabo el análisis cuantitativo por sustitución en la curva de calibración, se encontró que la toosendanina se encontraba en una cantidad de aproximadamente 1,15% del extracto de alcohol etílico de toosendan fructus.

<Ejemplo 4>**Medición de la citotoxicidad de un extracto de alcohol etílico de toosendan fructus**

60 La citotoxicidad se midió mediante un método de MTT. Como líneas celulares, se empleó la línea celular BA – 3 derivada de HEK293 (Yeon et. al., *Peptides*, 2007, 28: 838 - 844) que se utilizará para una prueba de inhibición de la producción PPAβ, HL60 (línea celular de leucemia humana), y HepG2 (línea celular del cáncer de hígado humano). Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a una concentración de 1×10^4 / 90 ul / pocillo, y se cultivaron durante 1 día. Cada material disuelto en DMSO se diluyó mediante un medio de cultivo de manera que una concentración final puede ser del 1 %, y luego cada línea celular fue tratada con el material, y se cultivaron

5 durante 3 días. Después del cultivo, se observó el estado de las células por un microscopio. Se añadió una solución MTT [bromuro 3 - (4, 5 - dimetiliazol - 2 il) - 2, 5 - difenil - 2H tetrazolio, 5 mg / ml en PBS] en una cantidad de 15 ul a cada pocillo, seguido por una reacción durante 4 horas a 37 °C. Cada pocillo se trató con 100 ul de tampón de lisis (HCl 0,01 N, 10% de SDS), y se dejó a 37 °C durante 24 horas para que el formazán formado pudiera disolverse completamente. A continuación, se midió la absorbancia a 570 / 652 nm. Como resultado, el BA - 3 tratado con el extracto de alcohol etílico de toosendan fructus no mostró citotoxicidad incluso a la concentración más alta de 100 ug / ml, mientras que el extracto de alcohol etílico de toosendan fructus mostró un efecto ligeramente inhibidor del crecimiento celular. Mediante la observación microscópica, la citotoxicidad no se encontró en HepG2 y HL60, tratado con el extracto de alcohol etílico de toosendan fructus, mientras que el crecimiento celular se inhibió. Cuando el extracto de toosendan Fructus inhibió el crecimiento de las células en un 50 %, sus concentraciones eran de 3,2 ug / ml y 34 ug / ml, respectivamente.

<Ejemplo 5>

15 **Análisis de un efecto inhibidor del metabolismo de una proteína precursora amiloide (PPA) por un extracto de toosendan Fructus y toosendanina en una célula**

<5 - 1> efecto inhibidor de la producción de PPA β

20 Se colocaron en una placa de 6 pocillos una línea celular BA - 3 derivada de HEK293 que sobreexpresa BACE1 (β - secretasa) y PPA695 utilizando DMEM (Medio de Eagle Modificado de Dulbecco) que incluye un 10 % de suero fetal bovino (SFB) de tal manera que ocupaba el 80 % o más de la zona de cada pocillo, y después se cultivó durante 1 día. Después de la eliminación del medio de cultivo, el DMEM libre (no incluyendo el suero fetal bovino) se calentó a 37 °C, y se añadió en una cantidad de 0,9 ml a cada pocillo. A continuación, toosendanina o una fracción de toosendan fructus se extrajo con cada disolvente se diluyó hasta una concentración apropiada por DMEM libre de 0,1 ml, y la línea celular se trató con estos materiales, y se cultivaron durante 24 horas. Se recogió 0,2 ml del medio de cultivo tratado con cada muestra de ensayo, y se sometió a electroforesis en un 8% de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida). A continuación, se utilizaron los anticuerpos AB1560 (monoclonales) y Rb53 (policlonales) (anticuerpos contra PPA α y PPA β) para medir las cantidades de PPA α y PPA β del medio de cultivo a través de Western Blot.

35 Como resultado, se encontró que los extractos de acetato de alcohol metanol / etilo / alcohol / etilo de toosendan fructus inhibieron la producción de PPA β , y favorecieron la producción de PPA α . En una prueba sobre el efecto de la producción inhibitoria de PPA β y la producción favorecedora de PPA α según las concentraciones de dilución del extracto de alcohol etílico, cuando la concentración de tratamiento del extracto fue de 6,25 ug / ml, la producción de PPA β se redujo al 27,7 %, y la producción de PPA α se aumentó al 131,3 %, con respecto a un grupo no tratado (de control, 100 %). Por otro lado, incluso cuando la concentración de tratamiento del extracto era más baja (menos de 0,05 μ g / ml), se logró un efecto de inhibición dependiente de la concentración de PPA β y se favoreció la producción de PPA α . También se encontró que la toosendanina purificada, incluso a una concentración de 12,5 nM o menos inhibió la producción de PPA β mientras que favoreció la producción de PPA α (en 0,8 μ m, la producción de PPA β redujo al 17,8 %, y la producción de PPA α aumentado al 141,5 %, con respecto a un grupo no tratado). Por lo tanto, se puede determinar que estos materiales inhiben muy fuertemente el metabolismo inhibitorio de PPA que favorece la producción de A β (véase la Figura 2).

45 Se obtuvieron extractos (alcohol etílico, metanol, acetato de etilo, y 90 % de metanol) de meliae cortex (corteza de cinamomo) en la misma condición de extracción de disolvente orgánico que toosendan Fructus. A continuación, se pusieron a prueba sus efectos sobre la reducción de la producción de PPA β . Como resultado, cada extracto mostró un efecto reductor de la producción de PPA β en 12,5 - 6,25 μ g / ml aunque el efecto fue menor que el del extracto de toosendan Fructus (véase la Figura 3.).

50 **<5 - 2> Efecto inhibitorio de la producción de A β mediante un extracto de toosendan fructus**

55 Se introdujeron los genes BACE1 (Número de acceso GenBank; AF190725) y la mutación sueca de PPA695 (Número de acceso GenBank; MIM: 104760,008) en vectores de pcDNA3.1 / Myc - His (Invitrogen, USA) y pcDNA3.1 / Hygro (Invitrogen, EE.UU.), respectivamente, y se introdujeron en líneas celulares CHO. Luego, utilizando una línea celular que sobreexpresa proteínas BACE1 y mutación sueca PPA695, se probó si el extracto toosendan fructus inhibía la producción de A β 40. Las líneas celulares CHO se cultivaron en una placa de 6 pocillos usando DMEM con un 10 % de SFB (suero fetal bovino) de tal manera que se incluyó en una cantidad apropiada en cada pocillo, y se cultivaron durante 1 día. Después de la eliminación del medio de cultivo, el DMEM libre (que no incluía suero fetal bovino) se calentó a 37 °C, y se añadió en una cantidad de 0,9 ml a cada pocillo. A continuación, se diluyó un extracto de toosendan Fructus con toosendanina hasta una concentración apropiada mediante 0,1 ml de DMEM libre, se trataron las líneas celulares con el extracto, y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, el medio de cultivo se separó, y se llevó a cabo el análisis cuantitativo mediante el kit de análisis cuantitativo A β 40 (High Specific Assay Kit Amyloid β (1 - 40), BioSource, CA) de BioSource (CA, EE.UU.).

65

Como resultado, se observó que el extracto de alcohol etílico de toosendan fructus (10 ug / ml o menos) mostró un efecto inhibitor de la producción de A β 40 del 50 % o más (véase la Figura 4).

<Ejemplo 6>

5

Ensayo de toxicidad en un extracto de alcohol etílico de toosendan fructus

10

Con el fin de determinar si la administración oral del extracto de alcohol etílico de toosendan fructus con toosendanina provoca toxicidad, se llevaron a cabo pruebas de toxicidad de una dosis única y de 4 semanas de dosis múltiples.

15

En la prueba de toxicidad de la dosis única, a cada grupo, que incluía 5 ratas macho ICR (de 6 semanas), se le administró por vía oral un extracto de alcohol etílico de toosendan fructus en una única dosis en una cantidad de 750 ~ 3000 mg / kg. Se observó durante 2 semanas si los animales experimentales sobrevivieron, y luego mediante la eutanasia y la autopsia, se observaron hallazgos anormales en órganos. Se descubrió que la administración del extracto en una cantidad de 1,500 mg / kg o más causó toxicidad, ya que algunas de las ratas murieron. Por otra parte, se descubrió que la administración del extracto en una cantidad de 1,000 mg / kg o menos no causó toxicidad, ya que no murió ninguna rata y no se observaron hallazgos anormales en órganos.

20

En la prueba de toxicidad de dosis múltiples, a cada grupo, que incluía 6 ratas macho ICR (de 6 semanas), se le administró por vía oral un extracto de alcohol etílico de toosendan fructus en una cantidad de 125 ~ 1,000 mg / kg una vez al día durante 26 días. Se observó un cambio de peso, síntomas generales, y mortalidad de los animales experimentales, y mediante la eutanasia y de la autopsia, se observaron hallazgos anormales en los órganos. Como resultado de la prueba, se descubrió que una dosis de tolerancia máxima (MTD) era de 750 ~ 1000 mg / kg, y un nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) era de 500 mg / kg.

25

<Ejemplo 7>

30

Un efecto sobre la mejora de la memoria y la función cognitiva por un extracto de alcohol etílico de toosendan fructus en un modelo animal de demencia

35

Se administró repetidamente un extracto de alcohol etílico de toosendan fructus en suspensión en 10% de Labrasol por vía oral a 6 ratas con demencia (transformadas para producir la mutación sueca de PPA) en una cantidad de 300 mg / kg (5 veces por semana) durante 3 meses. A continuación se llevaron a cabo una prueba del laberinto en Y, una prueba del laberinto de agua, y una prueba de evitación pasiva, y se analizó si se consiguió una mejora de la memoria a diferencia de un grupo de vehículos (al que se administró con 10% labrasol, 5 ratas).

<7 - 1> Prueba del laberinto en Y

40

La prueba se llevó a cabo utilizando un aparato de medición de laberinto en Y con 3 brazos (cada brazo: 25 (L) x 14 (A) x 5 (A) (cm)) formar una letra Y (brazo) en ángulos uniformes. En primer lugar, se dirigió la cabeza de un animal experimental hacia un extremo del brazo del laberinto Y, y al animal se le permitió correr libremente alrededor de los brazos durante 8 minutos. Cuando la pata trasera de la rata con demencia entró en el brazo se reconoció como una entrada en el brazo. El movimiento se registró como alternancia. A continuación, se reconocieron 3 entradas secuenciales como alternancia real, y se les dio 1 punto. A continuación, se obtuvo el comportamiento de alternancia espontánea (%) mediante el porcentaje de la alternancia real y la posible alternancia máxima (= alternancia total - 2).

45

50

Como resultado, el grupo al que se administró el extracto de alcohol etílico de toosendan fructus con toosendanina mostró un comportamiento de alternancia espontánea de $62,6 \pm 3,1$ %, y el grupo de vehículo (10 % de Labrasol) mostró $53,9 \pm 3,4$ %. Por lo tanto, se encontró que la administración del extracto de alcohol etílico de toosendan fructus mostró una mejora en la memoria del 16,1 % con una fiabilidad del 95 % o más ($p < 0,05$) (véase la Figura 5).

55

<7 - 2> Prueba del laberinto de agua

60

Se llevó a cabo una prueba de memoria de referencia para la prueba del laberinto de agua después de dejar a las ratas nadar libremente y adaptarse en un tanque de agua sin plataforma durante 60 segundos, un día antes de comenzar la prueba. En la prueba, el tiempo (latencia de escape, unidad: segundos) requerido para encontrar y montarse a la plataforma sumergida en agua se midió 4 a 5 veces por día, durante 5 días, y el tiempo máximo de tolerancia se limitó a 60 segundos. Hasta el segundo día de la prueba, cuando una rata no podía encontrar la posición de la plataforma, fue guiada para descubrirla en 60 segundos (tiempo límite). Luego, una vez que había montado a la plataforma, se le permitió permanecer allí durante 10 segundos.

65

Después de 24 horas desde el final de la prueba de memoria de referencia, se eliminó la plataforma dentro del tanque de agua, y a las ratas se les permitió nadar libremente durante 60 segundos. A continuación, se realizó

un ensayo de la prueba mientras se midió el tiempo de permanencia de una rata en la posición (donde estuvo la plataforma los días anteriores).

5 Como resultado, en la prueba de memoria de referencia, un grupo de vehículo no mostró mejora en el tiempo requerido para encontrar la plataforma durante el periodo de prueba, mientras que un grupo al que se administró un extracto de alcohol etílico de *toosendan fructus* descubrió la plataforma en un tiempo más corto que el grupo de vehículo, desde el segundo día de la prueba. Después, desde el cuarto día de la prueba, se maximizó la diferencia entre el grupo al que se administró el extracto y el grupo de vehículo (véase la Figura 6). En el ensayo de la prueba, el grupo al que se administró el extracto mostró una proporción de permanencia de $33,0 \pm 3,2$ % en la posición (donde estuvo la plataforma en los días anteriores), mientras que el grupo del vehículo mostró una proporción de $14,0 \pm 5,8$ %. Se descubrió que el grupo al que se administró el extracto se quedó 2,35 veces o más ($p < 0,05$) con una significación estadística.

15 <7 - 3> Prueba de evitación pasiva

El ensayo de evitación pasiva se llevó a cabo utilizando una *shuttle - box* con 2 compartimentos separados por una puerta de guillotina. Un compartimento se iluminó, mientras que el otro se oscureció cubriéndolo con un paño negro y sin iluminación. El primer día, una rata con demencia se quedó en la sala iluminada con un tiempo de búsqueda de 30 segundos, y luego se abrió la puerta de guillotina para que la rata pudiera entrar en el cuarto oscuro. A continuación, se midió el tiempo de adquisición de latencia requerido para entrar en el cuarto oscuro. Una vez que la rata entró en la habitación oscura, la puerta de guillotina se cerró, y se aplicó una descarga eléctrica de 0,5 mA a la rata durante 3 segundos mediante un suelo entramado, de manera que pueda recordar el choque eléctrico. Después de 24 horas, la rata con demencia se dejó en la habitación luminosa, con un tiempo de búsqueda de 30 segundos y luego se abrió la puerta de guillotina. A continuación, se midió un tiempo de latencia de retención requerido para entrar en el cuarto oscuro (todas las patas de la rata (máximo de 300 segundos). Se determinó que a medida que el tiempo de retención de latencia aumenta, puede mantenerse la memoria en la evitación pasiva mediante el aprendizaje.

30 Cuando se midió el tiempo de retención de latencia requerido para entrar en la habitación oscura tras el aprendizaje de una descarga eléctrica, un grupo al que se administró un extracto de alcohol etílico de *toosendan fructus* mostró un tiempo de retención de latencia de $288,8 \pm 9,2$ segundos, y un grupo de vehículo mostró un tiempo de retención de latencia de $131,8 \pm 59,6$ segundos. En otras palabras, se descubrió que el grupo al que se administró el extracto mostraba una mejora en la memoria de evitación pasiva del 220 % o más, con una fiabilidad del 95 % o más (véase la Figura 7). En consecuencia, se descubrió que la composición para su uso según la presente invención tiene un efecto significativo en el tratamiento de la disfunción de la memoria / cognición causada por la demencia.

35 <Ejemplo 8>

40 Efecto inhibidor de A β mediante el extracto de alcohol etílico de *toosendan fructus* y *toosendanina* en cuerpo vivo

45 <8 - 1> Efecto inhibidor de A β mediante el extracto de alcohol etílico de *toosendan fructus* en una rata con demencia transformada

Tras finalizar la prueba de memoria, se extrajo un cerebro de rata transformada. Entonces, en un tejido cerebral, se midió el cambio de A β . El cerebro extraído se pesó, y se añadió a una solución enfriada A (5 M de guanidina HCl, 50 mM de Tris HCl) en un volumen 8 veces superior respecto al peso. A continuación, el tejido cerebral se molió y se homogeneizó por un homogeneizador, y se dejó a temperatura ambiente durante 3 ~ 4 horas, seguido por centrifugación (16.000 xg, 20 minutos, 4 °C). Se recogió un sobrenadante para extraer el tejido cerebral. El sobrenadante recogido se diluyó 3.200 veces en una solución B (solución salina tamponada con fosfato, 5 % de BSA, 0,03 % de Tween - 20, pH 7,4, cóctel inhibidor de proteasa), y se cuantificó el A β 40 mediante el uso de un kit de análisis cuantitativo A β 40 de BioSource (CA, EE.UU.).

50 Como resultado, cuando se midió el valor de A β 40 con respecto al peso de tejido cerebral diluido 3.200 veces, el valor de un grupo de vehículo fue de $362,5 \pm 20,7$ pg / ml, y el valor de un grupo al que se administró el extracto de alcohol etílico de *toosendan fructus* fue de $111,9 \pm 84,6$ pg / ml. En otras palabras, la administración del extracto de alcohol etílico de *toosendan fructus* redujo el A β 40 en aproximadamente un 69 % (véase la Figura 8).

60 <8 - 2> Efecto inhibidor de A β por *toosendanina* en una rata

Se extrajo sangre antes de la administración de *toosendanina*. Después se administró *toosendanina* en suspensión en 20 % de alcohol etílico por vía oral en dosis de 5 y 50 mg / kg. Transcurridas dos horas, se recogió la sangre, y se midió el cambio de concentración de A β en sangre antes / después de la administración. La sangre recogida se centrifugó (16.000 xg, 20 minutos, 4 °C), y se cuantificó el A β 40 recogido en el suero utilizando un kit de análisis cuantitativo A β 40 (High Specific Assay Kit Amyloid β de ratón / rata (1 - 40), IBL, Japón).

Como resultado, un grupo de vehículo mostró un aumento de Aβ40 en alrededor del 40 % con la administración, sin significación estadística. Además, se descubrió que la administración de toosendanina (5 mg / kg) inhibió el Aβ40 en un 85 % o más. A partir de este resultado, se espera que si se administra toosendanina en una dosis más baja, la producción de Aβ40 pueda inhibirse (véase la Figura 9). En consecuencia, se determinó que la composición para su uso según la presente invención es altamente eficaz en la prevención o el tratamiento de la demencia inhibiendo la producción de Aβ.

<Ejemplo 9>

Ensayo de toxicidad y eficacia según un disolvente de extracción

Con el fin de obtener un extracto de menor toxicidad capaz de mantener la eficacia de la composición para su uso según la presente invención, se extrajo toosendan Fructus variando el contenido de alcohol etílico en un disolvente de extracción, y se llevaron a cabo pruebas de toxicidad y de eficacia.

<9 - 1> Preparación de un extracto de alcohol etílico de toosendan fructus

Se sumergieron 10 kg de toosendan fructus molido en 50 L de alcohol etílico (100 %, 70 %, 50 % y 30 %) durante 3 días para la extracción. Después, el extracto se filtró, se concentró al vacío, y se liofilizó para obtener un extracto de alcohol etílico de toosendan fructus.

<9 - 2> Prueba de toxicidad repetitiva en un extracto de alcohol etílico de toosendan fructus

Se prepararon un grupo de vehículo y tres grupos de administración según las concentraciones de alcohol de etilo, en los que cada grupo incluía 6 ratas macho ICR (de 6 semanas).

El extracto de alcohol etílico de toosendan fructus obtenido en el Ejemplo 9 - 1 se disolvió en 10 % de Labrasol (Gate Fosse Inc., Francia) como excipiente, y se administró por vía oral a una rata una vez al día. Se administraron extractos de alcohol etílico con concentraciones respectivas a cada grupo en dosis de 1,000, 1,500, y 2000 mg / kg.

El día de la administración se observaron los síntomas generales con un intervalo de una hora durante 6 horas desde la administración. Después, durante los días posteriores a la administración, se observaron y registraron una vez al día los síntomas generales. Dos veces a la semana, el animal se pesó en el día de ponderación. Tras el término de la administración, el animal se mantuvo en ayuno durante la noche, y luego se extrajo su sangre, y se sometió a un examen bioquímico. Después de la extracción de sangre, el animal fue sometido a una autopsia, y no se observaron hallazgos anormales en los órganos principales.

Para los animales de cada grupo, se registraron el peso medio según los días de medición y la mortalidad, y luego se obtuvieron MTD y NOAEL de la muestra de ensayo. Con el fin de determinar si había una diferencia en el peso medio y el valor bioquímico de la sangre entre un grupo control y los grupos de administración, se llevó a cabo una prueba de Dunnett como método de comparación múltiple, y se estableció una región crítica para la prueba al 5 % (* P < 0,05).

MTD se refiere a una dosis mínima de un material de ensayo administrada a un animal de ensayo que causará síntomas de toxicidad sin efecto en su muerte, y un aumento / disminución de peso en un 10 % o menos con respecto a un grupo control. NOAEL denota el nivel de exposición más alto en una prueba de toxicidad, en la que no hay ningún efecto perjudicial del material administrado en el largo plazo.

Como resultado, tal y como se señala en la Tabla 1, puesto que se redujo el contenido de alcohol etílico en la extracción, el NOAEL se incrementó. También se descubrió que en el extracto de alcohol etílico 30 %, no había toxicidad, incluso en la dosis máxima administración de 2000 mg / kg.

Tabla 1

Resultados de MTD y NOAEL según los disolventes de extracción		
Extracto de alcohol etílico	MTD (mg / kg)	NOAEL (mg / kg)
100 % de alcohol etílico	< 1.000	500 – 750
70 % de alcohol etílico	> 2.000	< 1.000
50 % de alcohol etílico	> 2.000	1.000 – 1.500
30 % de alcohol etílico	> 2.000	> 2.000

<9 - 3> Prueba de comparación de eficacia según los tipos de disolventes de extracción de un extracto de alcohol etílico de toosendan fructus

5 En el extracto de alcohol etílico de toosendan fructus obtenido en el Ejemplo 9 – 1, se midieron un efecto reductor de la producción de PPA β , un efecto favorecedor de la producción PPA α , y un efecto inhibidor de la producción de A β de la misma manera a la descrita en el Ejemplo 5.

10 Como resultado, tal y como se muestra en la Figura 10, se descubrió que el extracto de cinamomo utilizado en la presente invención obtenido a partir de alcoholes etílicos al 100 %, 70 %, 50 % y 30 % como disolvente de extracción son excelentes tanto en el efecto reductor de la producción de PPA β como del efecto favorecedor de la producción PPA α . Además, tal y como se muestra en la Figura 11, se descubrió que el efecto inhibidor de A β era generalmente alto, aunque la extracción mediante alcohol etílico al 30 % reducía la eficacia en un 14 %.

15 Según esto, cuando el extracto de cinamomo utilizado en la presente invención se extraía mediante alcohol etílico como disolvente de extracción, es posible conseguir una eficacia alta en general independientemente de la concentración del alcohol etílico. Especialmente, se descubrió que cuando el contenido de alcohol etílico utilizado como disolvente de extracción se ajustaba en un rango del 30 % al 50 %, era posible mantener la eficacia y reducir altamente la toxicidad del extracto de cinamomo utilizado en la presente invención.

20 Aunque se describen ejemplos de formulación de una composición farmacéutica para uso según la presente invención incluyendo el compuesto de la presente invención, estos ilustran específicamente la invención y no están destinados a limitar la misma.

<Ejemplo De Preparación 1>

25

Preparación de polvo

30	extracto de toosendan fructus	20 mg
	lactosa	100 mg
	talco	10 mg

Tras mezclar los ingredientes anteriores y rellenar una bolsa hermética, se prepararon en polvo.

<Ejemplo De Preparación 2>

35

Preparación de comprimidos

40	extracto de toosendan fructus	10 mg
	almidón de maíz	100 mg
	lactosa	100 mg
	estearato de magnesio	2 mg

45 Después de mezclar los ingredientes anteriores y realizar la compresión directa, se prepararon en comprimidos según un método bien conocido.

<Ejemplo De Preparación 3>

45

Preparación de cápsulas

50	extracto de meliae cortex	10 mg
	celulosa cristalizada	3 mg
	lactosa	14,8 mg
	estereato de magnesio	0,2 mg

55 Después de mezclar los ingredientes anteriores y rellenar una cápsula de gelatina, se dispusieron en la cápsula según un método bien conocido.

<Ejemplo De Preparación 4>

60

Preparación de inyección

65 El ingrediente activo se disolvió en agua destilada para su inyección según un método bien conocido, y se ajustó el pH a 7,5 y, a continuación, se disolvió el ingrediente anterior en agua destilada para su inyección. A continuación se llena una ampolla de 2 ml, se esteriliza y se preparó la inyección.

	extracto de toosendan fructus	1 mg
--	-------------------------------	------

manitol	180 mg
agua para inyección	2793 mg
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	26 mg

5 Se preparó una ampolla (2 ml) por los ingredientes anteriores según un método bien conocido.

<Ejemplo De Preparación 5>

Preparación de Fluido

10

extracto de toosendan fructus	2 mg
jarabe de glucosa isomerizada	10 mg
manitol	5 mg

15

agua destilada apropiada

Según un método bien conocido, se disuelven todos los ingredientes en agua destilada y se añade sabor a limón, luego se mezcla y se ajusta el volumen a 100 ml añadiendo agua destilada. Después del ajuste, se envasa en botellas de color marrón y se esteriliza.

20 **Aplicabilidad industrial**

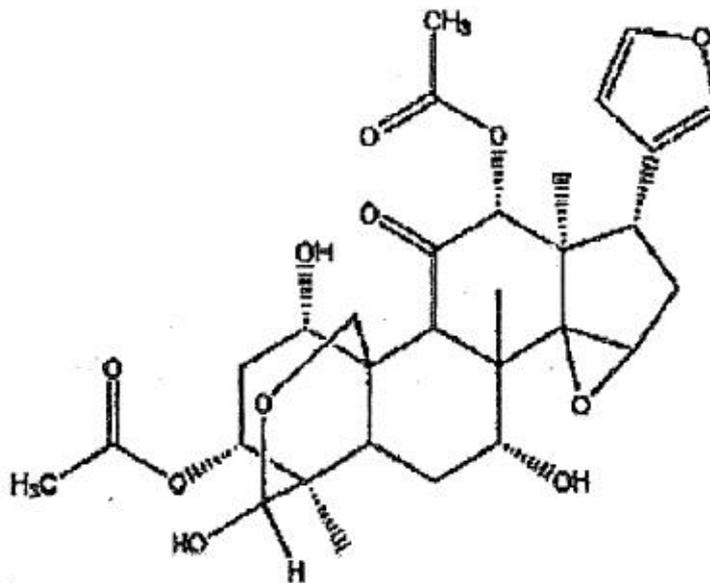
25 Como puede verse en lo anteriormente descrito, una composición farmacéutica para uso según la presente invención que comprende extracto de cinamomo, toosendanina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es un ingrediente activo muy eficaz en la prevención o el tratamiento de la demencia. Especialmente, la composición para su uso según la presente invención es eficaz en la inhibición de la producción y la inducción de la mejora de la producción de PPA α que muestra un efecto protector de una célula nerviosa A β . Por lo tanto, la composición farmacéutica para uso según la presente invención que comprende extracto de cinamomo, toosendanina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como ingrediente activo, es altamente eficaz en diversos campos tales como la preparación de medicamentos / tratamiento preventivo de pacientes con demencia o personas de edades susceptibles a la demencia.

30

REIVINDICACIONES

1. Una composición para utilización en la prevención o tratamiento de la demencia que comprende toosendanina representada por la fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como ingrediente activo.

[Fórmula 1]



- 5 **2.** La composición para utilización en la prevención o tratamiento de la demencia según la reivindicación 1, en la que la demencia es seleccionada del grupo formado por: demencia de Alzheimer, demencia cerebrovascular, demencia senil, y demencia por lesiones cerebrales.
- 10 **3.** Uso de toosendanina representada por la fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para preparar un agente para la prevención o tratamiento de la demencia.
- 4.** El uso de la reivindicación 3, en el que la demencia es seleccionada del grupo formado por: demencia de Alzheimer, demencia cerebrovascular, demencia senil, y demencia por lesiones cerebrales.
- 15 **5.** Una composición para utilización en la prevención o tratamiento de la demencia que comprende extracto de cinamomo (*Melia azedarach* o *Melia toosendan*) como ingrediente activo.
- 6.** La composición para utilización en la prevención o tratamiento de la demencia según la reivindicación 5, en la que el cinamomo es toosendan fructus (fruto del cinamomo) o *Meliae cortex* (velamen o corteza del cinamomo).
- 20 **7.** La composición para utilización en la prevención o tratamiento de la demencia según la reivindicación 5, en la que el extracto es extraído con acetato de etilo o agua, alcohol C1 a C6 o un disolvente mezclado de los mismos.
- 25 **8.** La composición para utilización en la prevención o tratamiento de la demencia según la reivindicación 5, en la que la demencia es seleccionada del grupo formado por: demencia de Alzheimer, demencia cerebrovascular, demencia senil, y demencia por lesiones cerebrales.
- 30 **9.** Uso del extracto de cinamomo (*Melia azedarach* o *Melia toosendan*) para preparar un agente para la prevención o tratamiento de la demencia.
- 10.** El uso de la reivindicación 9, en el que la demencia es seleccionada del grupo formado por: demencia de Alzheimer, demencia cerebrovascular, demencia senil, y demencia por lesiones cerebrales.

FIG. 1

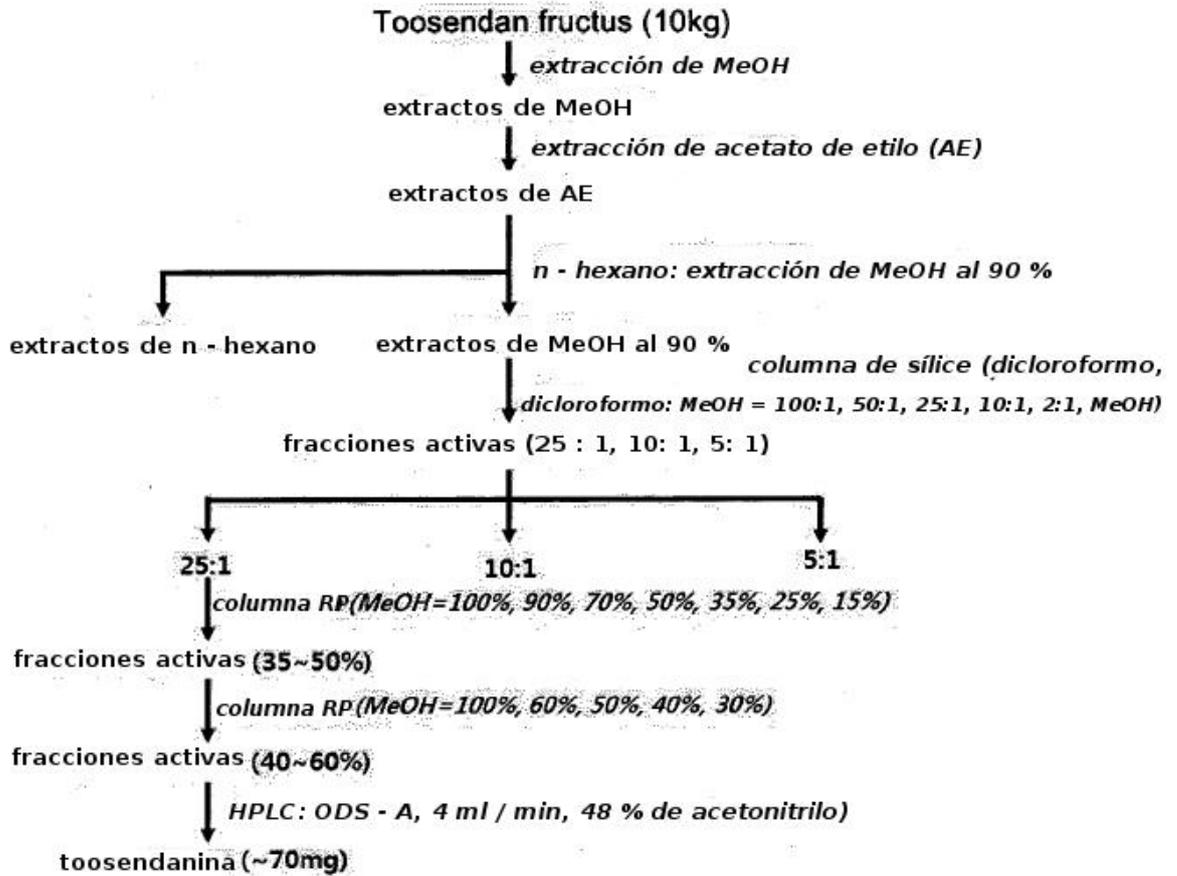


FIG. 2

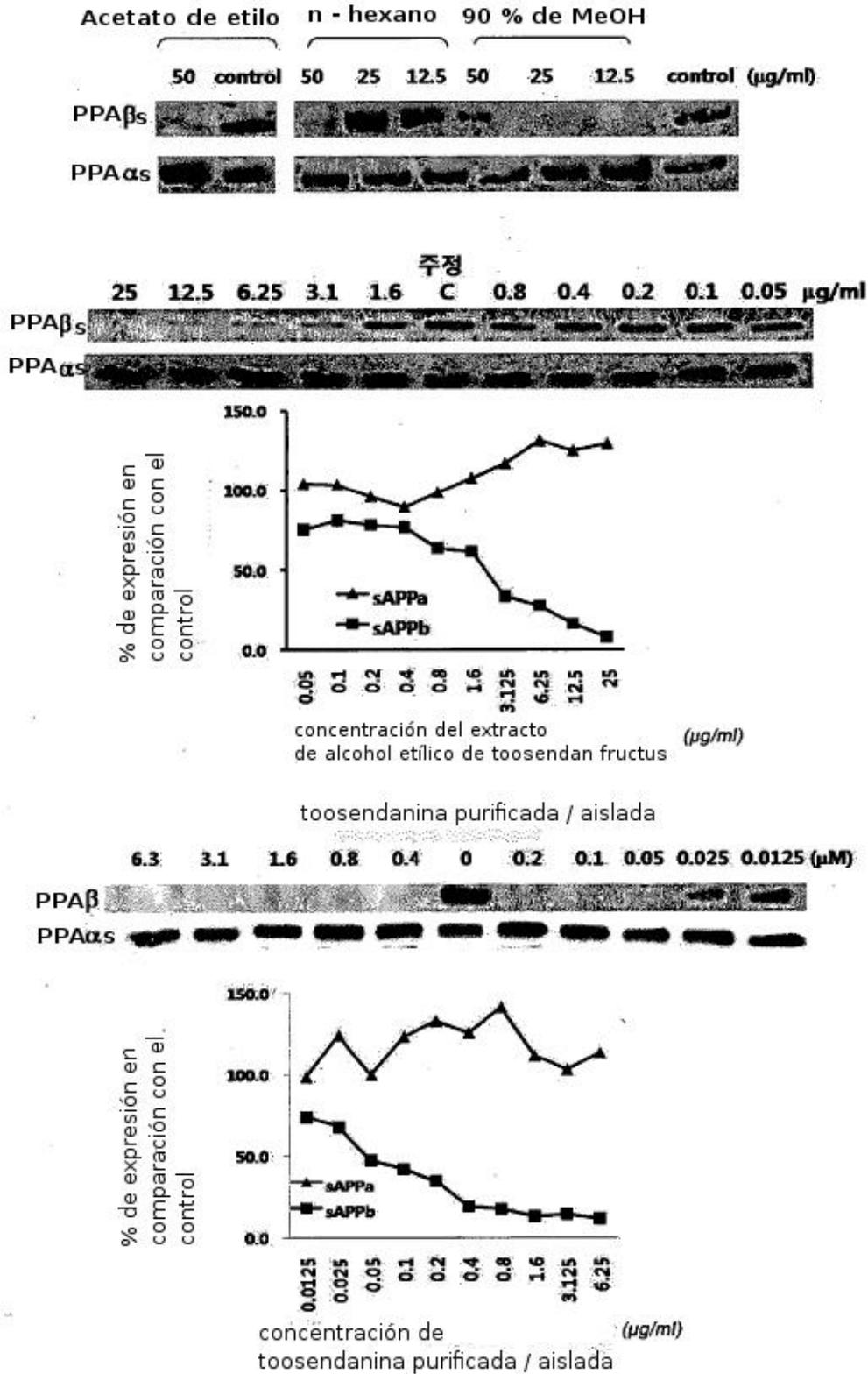


FIG. 3

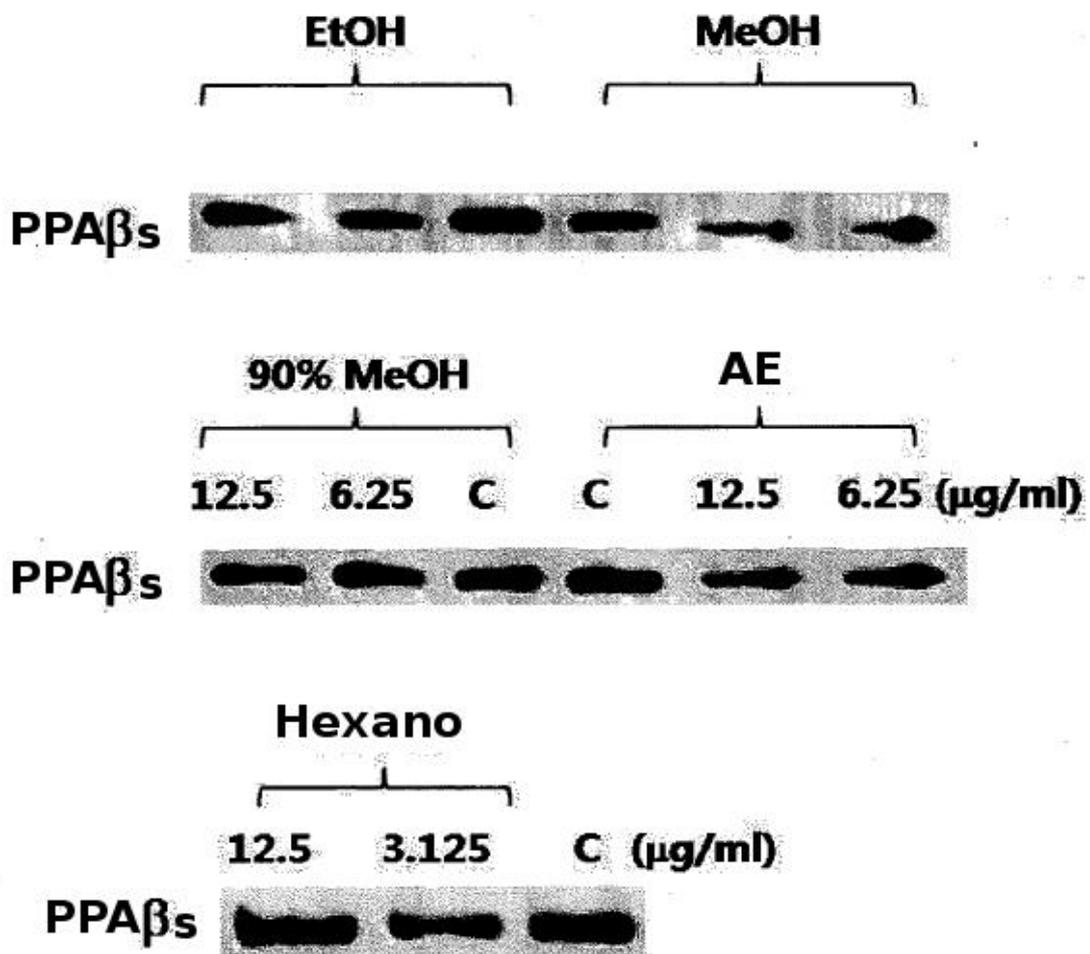


FIG. 4



FIG. 5

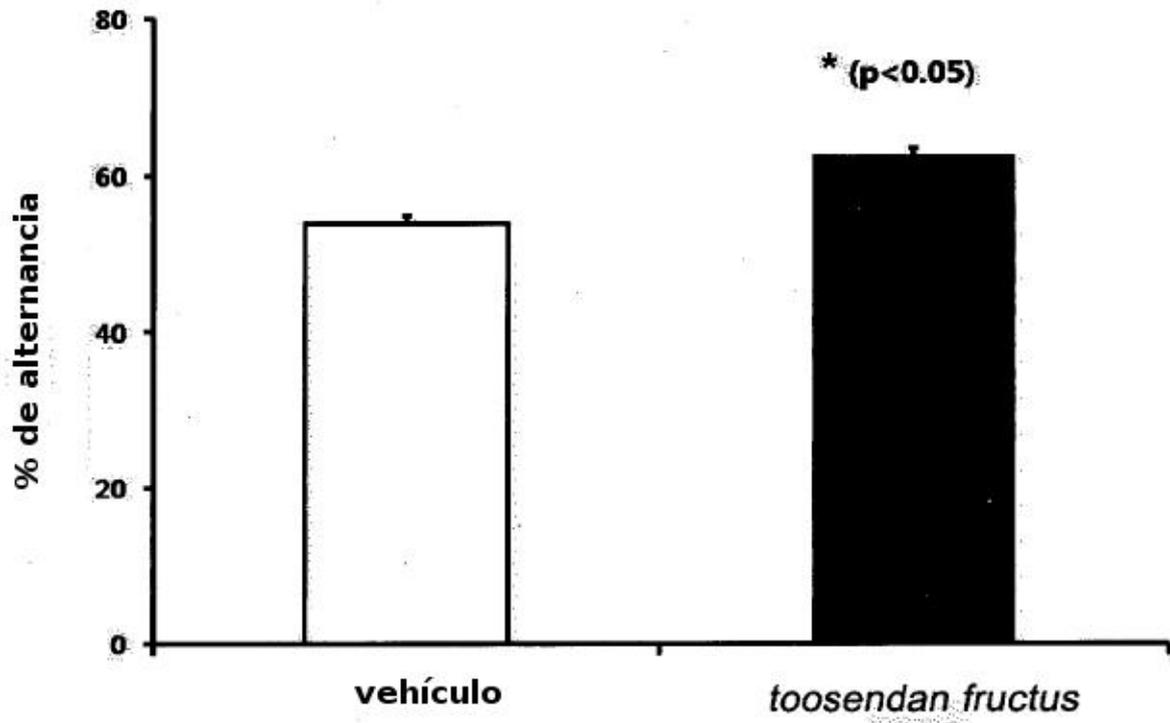


FIG. 6

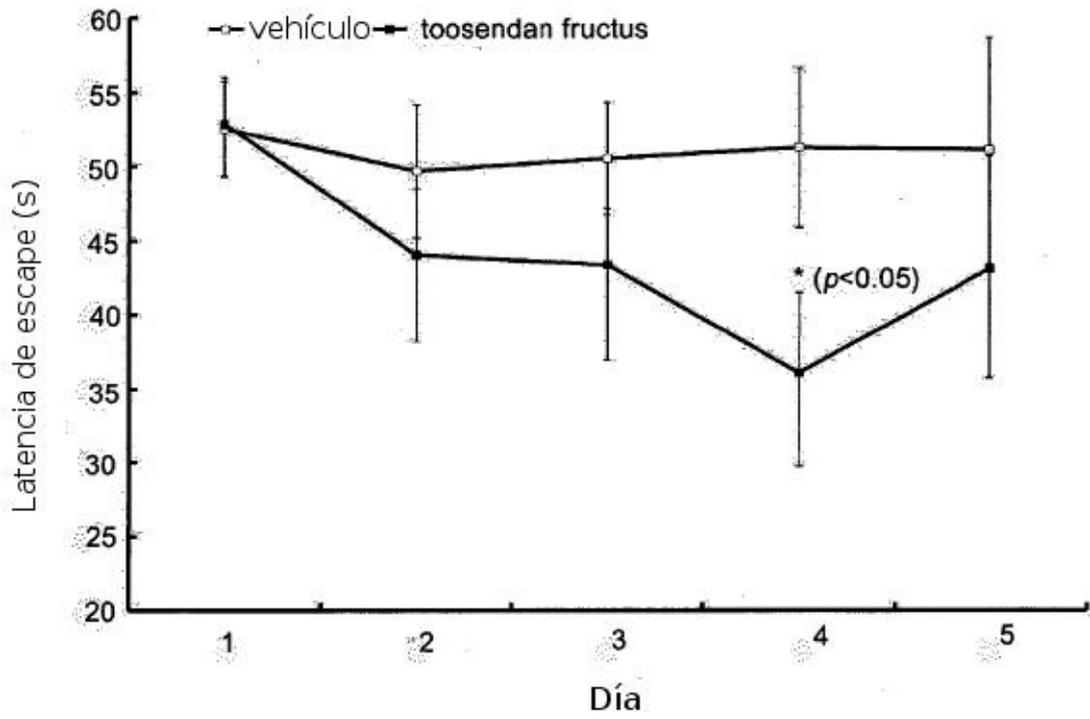


FIG. 7

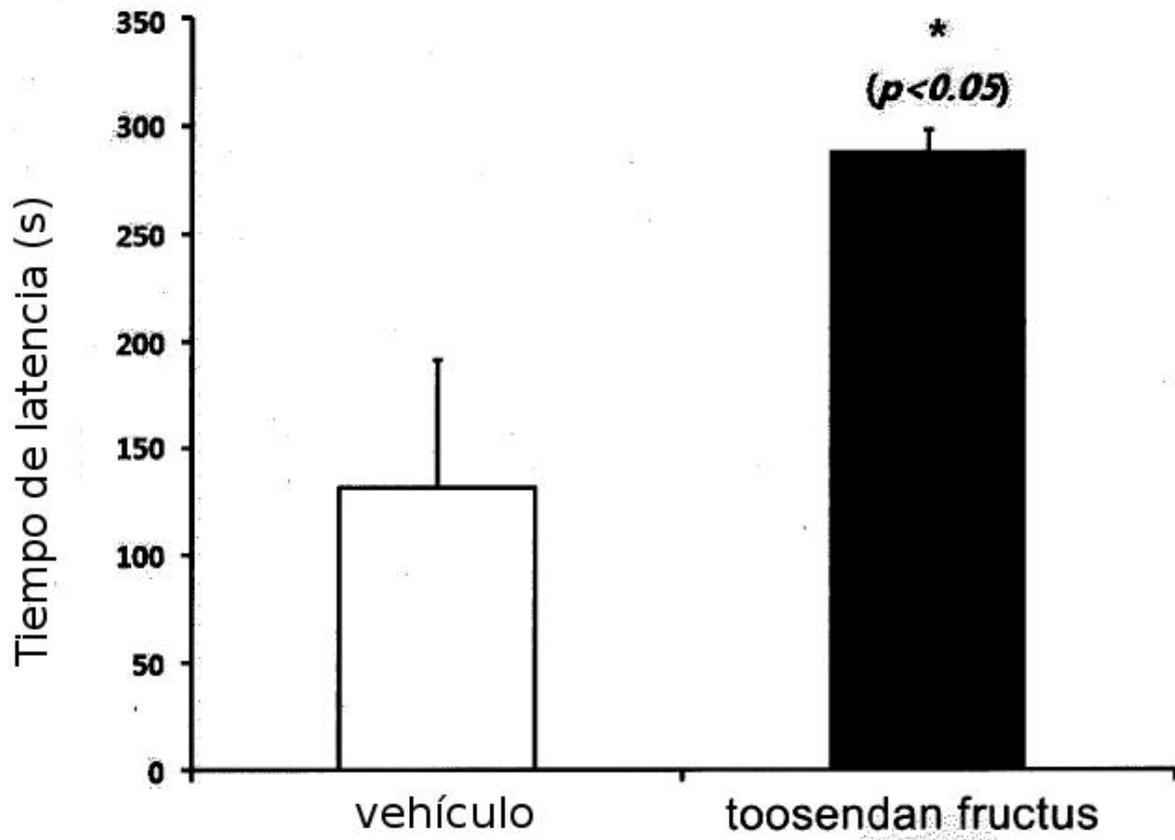


FIG. 8

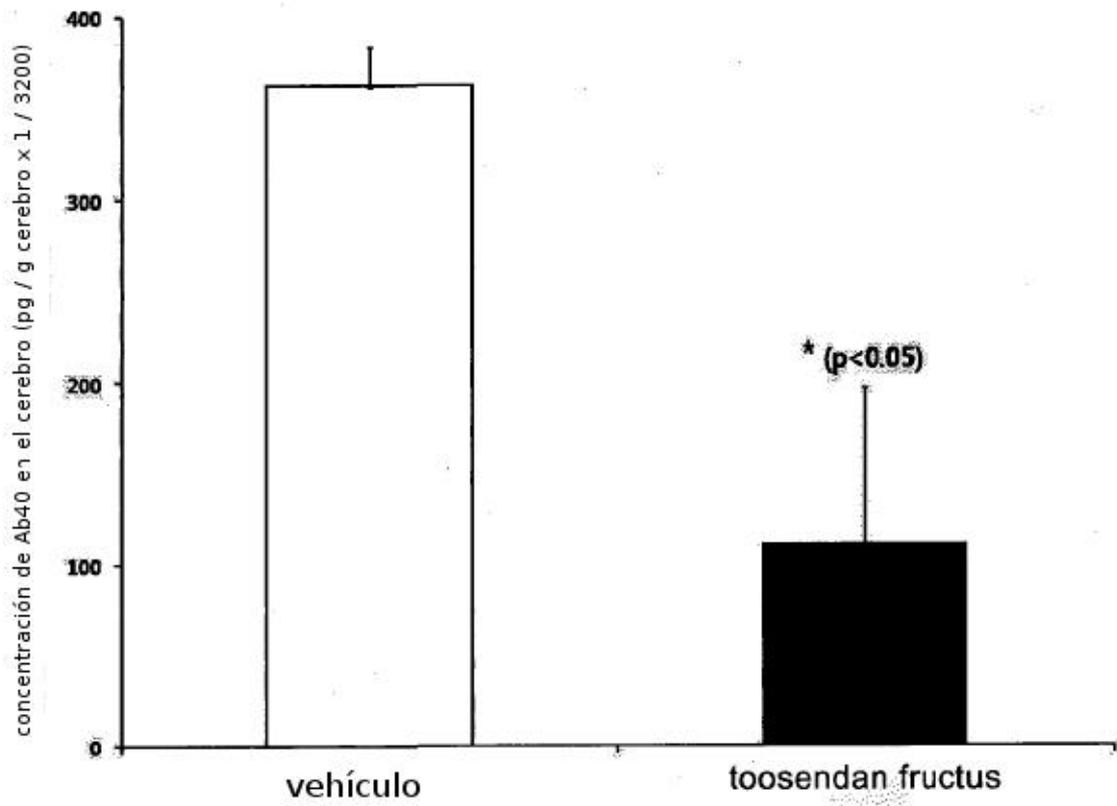


FIG. 9

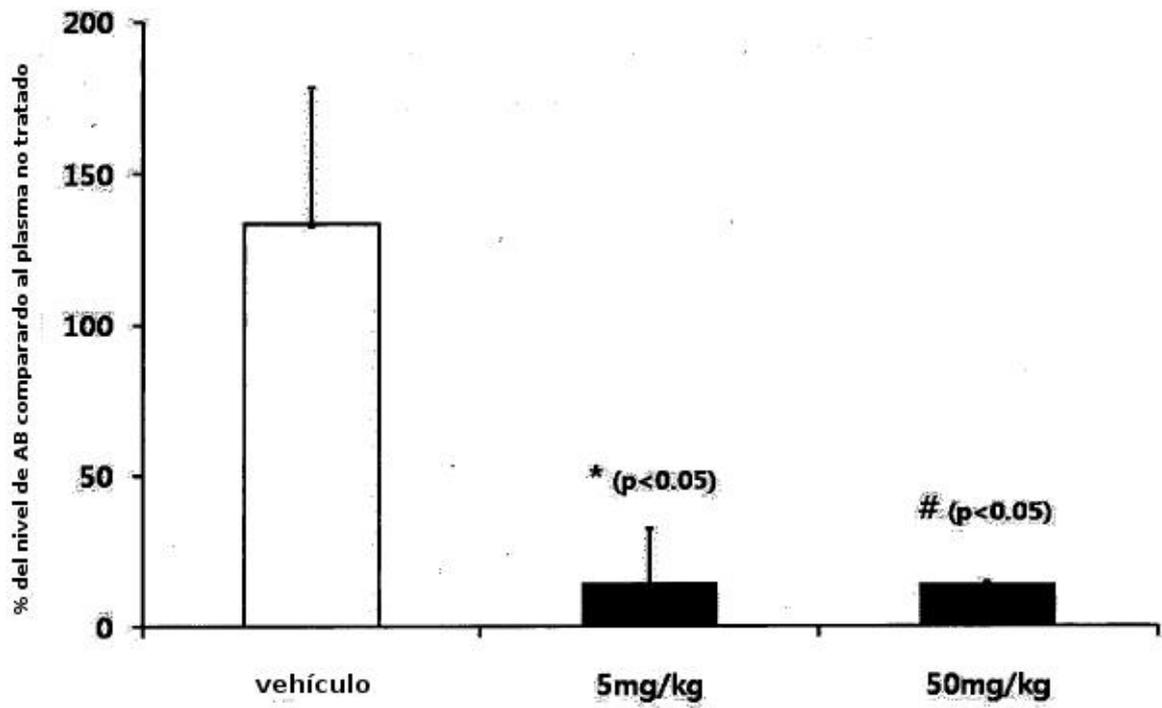


FIG. 10

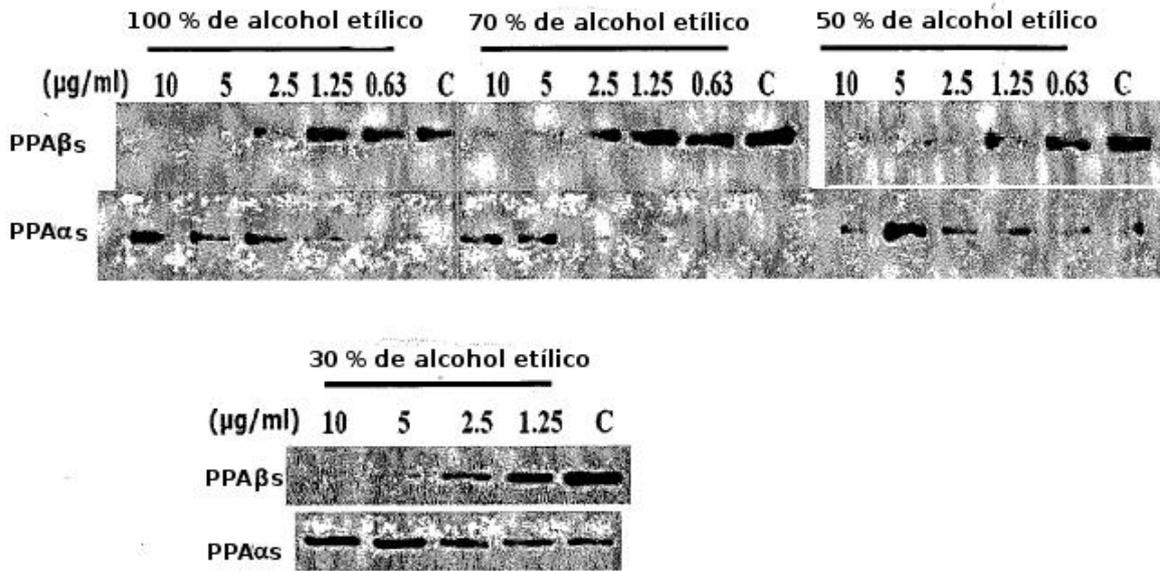


FIG. 11

