

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 494 919**

51 Int. Cl.:

A61K 36/71 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2005** **E 05726607 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014** **EP 1843774**

54 Título: **Extractos de Pulsatilla spp. eficaces en la función cerebral**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.09.2014

73 Titular/es:

SK CHEMICALS CO., LTD. (100.0%)
600, Jungja 1-dong Jangan-gu Suwon-si
Gyeonggi-do 440-301, KR

72 Inventor/es:

CHOI, WONRACK;
HAN, CHANG-KYUN;
SEO, JUNG-WOO;
IM, GUANG-JIN;
JUNG, CHILMANN;
YUN, SE JUN;
KWAK, WIE-JONG;
KIM, TAE KON;
KIM, BONG CHEOL y
LEE, SOOMIN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 494 919 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

Extractos de *Pulsatilla* spp. eficaces en la función cerebral

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a extracto de *Pulsatillae Radix* para mejorar las funciones cerebrales. Más específicamente, la presente invención se refiere a extracto de *Pulsatillae Radix*, a sus fracciones activas y a un producto farmacéutico y un alimento saludable que lo contienen, que tienen, respectivamente, una actividad de protección frente a la neurotoxicidad inducida por beta-amiloide, un efecto inhibitor del crecimiento de beta-amiloide, un efecto antioxidante, un efecto de proliferación de neuronas y mejora de una memoria debilitada, y que por lo tanto son eficaces en la mejora de las funciones cerebrales, tales como deterioro cognitivo leve (DCL) y demencia.

El creciente porcentaje de un grupo senil en la población ha sido una tendencia global, incluyendo en Corea, y varios tipos de enfermedades seniles degenerativas conducen a grandes pérdidas en la sociedad y la economía. De acuerdo con la estadísticas recientemente publicadas por la Asociación de Alzheimer en EE.UU. y la Asociación Americana del Envejecimiento, aproximadamente 4 millones de americanos sufren demencia. En particular, la demencia generalmente se desarrolla después de los 60 años de edad, y rara vez en la década de los 50. Aproximadamente el 10,3 % de los americanos sufren demencia en la actualidad y anualmente se están gastando aproximadamente 95 billones de dólares americanos para los tratamientos terapéuticos de los pacientes de demencia. De acuerdo con el informe del Korea Institute for Health and Social Affairs, el porcentaje de pacientes con demencia en la población de Corea aumento rápidamente hasta representar el 8,3 % de los ciudadanos mayores de 65 años de edad o mayores en 1995 y cabe esperar que alcance el 9 % en el año 2010, un incremento del 0,7 %. Los porcentajes anteriores, cuando se aplican a una estimación futura de la población de Corea de acuerdo con la Korea National Statistical Office, reveló que los pacientes de demencia eran 277.048 en 2000 (8,3 % de los ciudadanos mayores de 65 años de edad o mayores), 527.068 en 2015 (9 % de los ciudadanos de la tercera edad mayores de 65 años), y 619.132 in 2020 (9 % de los ciudadanos de la tercera edad de 65 años o mayores), respectivamente. La demencia es una enfermedad intratable que puede devastar no solo a los propios pacientes, sino también a los miembros de su familia directa y, por tanto, se ha convertido en un problema social y económico grave.

El deterioro cognitivo leve (DCL) se refiere a un estado de salud en el que disminuyen las funciones cognitivas, como la memoria, los juicios y las capacidades de aprendizaje, pero no es tan grave como para cumplir los criterios de demencia desde el punto de vista clínico. No obstante, en los recientes estudios clínicos se ha demostrado que es muy probable que los pacientes con DCL desarrollen demencia. En los experimentos clínicos, por ejemplo, se demostró que sólo el 1 - 2 % del grupo normal control desarrolló demencia cada año, mientras que hasta un 10 - 15 % de los pacientes con DCL desarrollaron demencia. Por consiguiente, es importante para los pacientes de DGL obtener un tratamiento precoz con el fin de prevenir el desarrollo de demencia. Existen varias razones por las cuales se puede producir el desarrollo de demencia y la enfermedad de Alzheimer se ha conocido como una de las causas más factibles de la misma. La enfermedad de Alzheimer se caracteriza porque la proteína beta-amiloide se deposita fuera de las células cerebrales y la capacidad de aprendizaje y la memoria disminuyen drásticamente.

Antecedentes de la invención

La tacrina es el primer fármaco aprobado por la FDA, y se desarrolló en 1993 para tratar la enfermedad de Alzheimer. Se sabe que inhibe la secreción de la acetilcolina producida en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer en sus primeras etapas o en las intermedias, de modo que se retrasa el proceso del deterioro cognitivo. No obstante, se sabía que producía efectos adversos relacionados con el hígado y apenas se usa en la actualidad. Aricept, otro fármaco aprobado por la FDA desarrollado en 1996, actúa aumentando el uso de acetilcolina y puede prolongar su eficacia mediante una única dosis antes de acostarse. Tiene efectos adversos tales como náuseas, diarrea y fatiga, pero dichos síntomas no son demasiado graves y también desaparecen fácilmente. No obstante, la tacrina y el aricept no pueden invertir el inicio de la enfermedad de Alzheimer ya desarrollada y tampoco se sabe cuánto tiempo deben tomar los pacientes de demencia los fármacos requeridos y cuándo tiempo tendrán eficacia los fármacos administrados. Por tanto, existe una necesidad muy urgente de desarrollar un agente terapéutico para tratar la demencia con eficacias excelentes y pocos efectos adversos.

Pulsatillae Radix es una planta perenne perteneciente a la familia del ranúnculo (*Ranunculaceae*) de plantas dicotiledóneas y tiene algunos otros nombres. La base desecada de *Pulsatilla chinensis* (Bge) Reg, *P. koreana* Nakai, *P. cernua* Var, *P. patens* y sus especies se usa para preparar agentes terapéuticos que tienen efectos de defervescencia, convergencia, antiinflamación, esterilización etc., así como efectos contra la diarrea producida por la disentería. En las terapias medicinales tradicionales coreanas, también se ha usado para tratar el paludismo y la neuralgia, pero no se han producido informes científicos de que tenga un efecto terapéutico para tratar la demencia.

El documento EP-A-1 388 542 divulga el uso de un extracto de *Pulsatillae Radix* como agente terapéutico para tumores sólidos.

El documento WO 2004/026275 A está dirigido al efecto de blanqueamiento de una composición cosmética que comprende un extracto de *Pulsatillae Radix* como ingrediente principal.

5 SHIMIZU M., et al. ("Triterpenoid saponins from Pulsatilla cernua" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN, TOKYO, JP, vol. 26, 1 de enero de 1978, páginas 1666 - 1671) describen saponinas triterpenoides de *Pulsatilla cernua* y mencionan el uso de la raíz de *Pulsatilla cernua* como remedio doméstico para fines antitumorales, astringentes, antilaxantes y diuréticos.

10 GAO XIANG-DONG, et al. ("Pulsatilloside A and anemoside A3 protect PC12 cells from apoptosis induced by sodium cyanide and glucose deprivation." PLANTA MEDICA, vol. 69, N° 2, febrero de 2003, páginas 171 - 174) divulgan que el pulsatilosido A y el anemósido A₃ protegen las células PC12 de la apoptosis inducida por cianuro sódico y privación de glucosa.

15 Sumario de la invención

Los inventores de la presente invención han realizado intensas y amplias investigaciones para desarrollar un agente terapéutico para tratar la demencia impidiendo la neurotoxicidad inducida por beta-amiloide y un efecto inhibitor sobre la formación de beta-amiloide y, también, mediante un efecto antioxidante, un efecto de proliferación de neuronas y de mejora de la memoria debilitada. Como resultado, los inventores de la presente invención finalmente 20 tuvieron éxito en la obtención de un extracto útil y sus fracciones activas a partir de *Pulsatillae Radix*.

Por tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un extracto útil y sus fracciones activas de *Pulsatillae Radix*, que tenga una actividad protectora contra la neurotoxicidad inducida por beta-amiloide, un efecto inhibitor sobre la formación de beta-amiloide, un efecto antioxidante un efecto de proliferación de neuronas y de mejora de la memoria debilitada. 25

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para preparar el extracto útil anterior y sus fracciones activas a partir de *Pulsatillae Radix*.

30 Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un producto farmacéutico y un alimento saludable que contenga el extracto útil anterior y sus fracciones activas obtenidas de *Pulsatillae Radix*, que sea eficaz en la mejora de las funciones cerebrales.

35 Descripción detallada de las realizaciones

La presente invención se refiere a un extracto de *Pulsatillae Radix*, sus fracciones activas y a un método para preparar el mismo.

40 Adicionalmente, la presente invención también se refiere a un agente terapéutico que comprende un extracto de *Pulsatillae Radix* o sus fracciones activas para la mejora de las funciones cerebrales, prevención y tratamiento del deterioro cognitivo leve, prevención y tratamiento de la demencia, y a un producto alimentario saludable que comprende un extracto de *Pulsatillae Radix* o sus fracciones activas para mejorar las funciones cerebrales.

La presente invención se describe con mayor detalle como se indica a continuación en el presente documento.

45 La presente invención se refiere a extracto de *Pulsatillae Radix* para mejorar las funciones cerebrales. Más específicamente, la presente invención se refiere a extracto de *Pulsatillae Radix*, a sus fracciones activas y a un producto farmacéutico y un alimento sano que lo contiene, que tienen, respectivamente, una actividad de protección frente a la neurotoxicidad inducida por beta-amiloide, un efecto inhibitor sobre la formación de beta-amiloide, un efecto antioxidante, un efecto de proliferación de neuronas y mejora de una memoria debilitada, y que por lo tanto es 50 eficaz en la mejora de las funciones cerebrales tales como el deterioro cognitivo leve (DCL) y la demencia.

Son ejemplos de *Pulsatillae Radix* para usar como material de partida en la presente invención *Pulsatilla chinensis*, *Pulsatilla koreana*, *Pulsatilla cernua*, *Pulsatilla patens* and *Pulsatilla sp.*, es decir, una planta perteneciente a la familia del ranúnculo (*Ranunculaceae*). Los principales usos de *Pulsatillae Radix* son como antiinflamatorio, de 55 convergencia, hemostático y antidiarreico.

En una realización preferida de la presente invención se proporciona un método para aislar con eficacia el extracto de *Pulsatillae Radix* y sus fracciones activas, que tienen efectos terapéuticos excelentes, como se expone a 60 continuación en el presente documento.

Primero, se tritura *Pulsatillae Radix* y después se extrae usando alcohol añadiendo aproximadamente de 5 a 10 veces un alcohol de grado bajo con referencia al peso de *Pulsatillae Radix* basado en su peso herbal, preferentemente un alcohol C₁ - C₆, más preferentemente una solución de MeOH o de EtOH. Después de realizar la extracción con alcohol 2 - 4 veces, se filtra el extracto y después se concentra a presión reducida para eliminar completamente el alcohol y de este modo facilitar un seguimiento fácil de las fracciones de disolvente. Después, el 65

extracto se disuelve completamente o se suspende en aproximadamente de 3 a 5 veces (v/p) de agua destilada con referencia al peso de *Pulsatillae Radix* basado en su peso herbal. En el presente documento se prefiere usar una cantidad suficiente de agua para la disolución completa del extracto pero, debido a las incomodidades en la manipulación de una gran cantidad de agua, a menudo se procede con las siguientes etapas, incluso cuando el extracto no se haya disuelto completamente. Después, el resultante se añade con un peso igual de un alcohol de grado bajo saturado con agua y después se agita a una velocidad de aproximadamente 30 a 50 rpm durante de 10 a 20 minutos y después se deja generar la separación de capas. El alcohol de grado bajo saturado en agua se filtra y después se concentra a presión reducida para obtener una fracción activa. El alcohol de grado bajo saturado en agua usado anteriormente es una solución saturada de un alcohol de grado bajo que se obtiene: añadiendo agua destilada a un alcohol de grado bajo, agitando, dejando que se generen capas separadas y recolectando el alcohol de grado bajo saturado en agua. El alcohol de grado bajo anterior es, preferentemente, un alcohol C₁ - C₆, más preferentemente un propanol o un butanol. La separación de capas se repite 2-3 veces. En la obtención de una fracción de disolvente usando alcohol de grado bajo, si se usa una cantidad pequeña del alcohol de grado bajo, el resultado de la purificación es malo, lo que disminuye el rendimiento del extracto y la cantidad de ingredientes activos. Por el contrario, si se usa una gran cantidad del alcohol de grado bajo, no es rentable. Por tanto, es preferible usar de aproximadamente 2 a 3 veces (v/p) de un alcohol de grado bajo con referencia al peso de *Pulsatillae Radix* basado en su peso herbal. Las actividades del extracto preparado de este modo y sus fracciones activas se analizaron y se demostró que eran eficaces en la actividad de protección contra la neurotoxicidad debido al beta-amiloide.

La cromatografía en columna usando resina de sílice de octadecilo (YMC*GEL ODS-A 12nm, S-150 m) se realizó para definir las fracciones activas y los compuestos con el nivel de actividades más alto de las fracciones de disolvente de *Pulsatillae Radix*. Se usó una cantidad de resina de aproximadamente 25 veces el peso de una muestra. Para usar el disolvente se seleccionó un método de gradiente por etapas; es decir, la cantidad de metanol en el disolvente se incrementó gradualmente al índice del 10 % (v/v) comenzando con la solución en metanol al 10 % (v/v) inicial (hasta) aproximadamente 2 a 3 veces el volumen de la resina. La actividad de protección contra la neurotoxicidad debido al beta-amiloide se observó en las fracciones con soluciones en metanol del 60 % (v/v), 70 % (v/v) y 80 % (v/v) y, de ellos, el efecto más alto como tal se observó al 70 % (v/v).

En experimentos con animales, en los que un grupo control no tratado con escopolamina, una sustancia que se sabe que disminuye la capacidad de memoria inhibiendo la transmisión de un neurotransmisor, o cualquier otro fármaco, se fijó en 100 % y un grupo tratado con escopolamina (1 mg/kg) se fijó en 0 %, la administración del extracto de *Pulsatillae Radix* y sus fracciones en el grupo tratado anterior 1 hora después del tratamiento con escopolamina tuvo como resultado una mejora de la capacidad de memoria. Además, la fracción activa que mostró la actividad más alta en el experimento anterior tenía una actividad inhibitoria contra las toxicidades inducidas por peróxido de hidrógeno y estaurosporina, tenía un efecto de proliferación celular, así como un efecto de incremento de la actividad alfa-secretasa. Adicionalmente, el grupo anterior también mostró una memoria mejorada en un experimento animal realizado mediante la prueba del laberinto de agua. Por tanto, se ha sugerido que el extracto de *Pulsatillae Radix* (o sus fracciones) de la presente invención será útil para el tratamiento del DCL y la demencia, y también se puede formular como un producto farmacéutico o un producto alimentario saludable.

En la preparación del extracto de *Pulsatillae Radix* (o sus fracciones) de la presente invención como producto farmacéutico, se puede formular en un tipo típico de preparaciones farmacéuticas que se van a administrar por vía oral o parenteral en estudios clínicos. Más específicamente, se puede fabricar usando los aditivos típicos, tales como una carga, un diluyente, un aglutinante, un agente humectante, un agente disgregante, un tensioactivo y un excipiente.

Las preparaciones sólidas para administración oral son comprimidos, píldoras, polvo, gránulos, cápsulas etc. Las preparaciones sólidas anteriores se fabrican añadiendo al menos un excipiente tal como almidón, carbonato cálcico, sacarosa o lactosa, gelatina, lignano, compuestos de lactona y sus derivados. Además, además de los excipientes típicos se pueden usar lubricantes tales como estearato de magnesio y talco.

Las preparaciones líquidas para administración oral son suspensiones, soluciones, emulsiones, jarabes y se pueden usar varios excipientes tales como un agente humectante, un edulcorante, un agente aromático, un conservante además de los diluyentes típicos, tales como agua y parafina líquida.

Las preparaciones para administración parenteral son un líquido hidrosoluble estéril, un disolvente insoluble en agua, suspensiones, emulsiones, un agente liofilizante y supositorios. Son ejemplos de suspensiones y disolventes insolubles en agua aceites vegetales tales como propilenglicol, polietilenglicol, aceite de oliva y ésteres inyectables tales como etiolato. Son ejemplos de la base para supositorios witepsol, marcrogol, Tween 61, manteca de cacao, Sevum Laurinum, glicerol, gelatina y similares.

El contenido de los ingredientes activos de las preparaciones en la presente invención se puede ajustar según sea adecuado de acuerdo con la capacidad de absorción, la tasa de inactivación, la tasa de excreción de los ingredientes activos, la edad, el sexo y el estado de salud de un paciente.

El extracto de *Pulsatillae Radix* (o sus fracciones) de la presente invención se administra, preferentemente, en el

intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 400 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 mg/kg, y de aproximadamente 1 a 3 veces al día.

Adicionalmente, en otra realización de la presente invención se proporciona un producto alimentario saludable para el tratamiento terapéutico de DCL y la demencia, y la mejora de las funciones cerebrales, que comprende el extracto de *Pulsatillae Radix* (o sus fracciones). El producto alimentario saludable de la presente invención hace referencia a un producto fabricado mediante la adición del extracto de *Pulsatillae Radix* (o sus fracciones) a los productos alimentarios generales o mediante la formulación en forma de cápsulas, polvo y suspensiones, cuya ingesta tendría como resultado un efecto terapéutico determinado relacionado con las condiciones de salud pero sin causar ningún efecto adverso, incluso con la administración a largo plazo al contrario que los fármacos convencionales.

Breve descripción de las figuras

Estos y otros objetos y características de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de la invención, cuando se consideran junto con las figuras adjuntas, en las que:

La Fig. 1 muestra un método de preparación del extracto de *Pulsatillae Radix* y sus fracciones de acuerdo con una realización mostrada en el Ejemplo 2 de la presente invención.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra la eficacia del extracto de *Pulsatillae Radix* y sus fracciones en la mejora de los déficit de memoria inducidos con escopolamina mediante una única administración oral del extracto de *Pulsatillae Radix* y sus fracciones.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra los resultados de comparación entre un grupo control y grupos tratados con varias concentraciones de las fracciones activas del extracto de *Pulsatillae Radix* con respecto al efecto de las fracciones activas del extracto de *Pulsatillae Radix* mediante una función de adquisición que mide el tiempo de latencia necesario para que los animales experimentales alcancen la plataforma de escape en 180 segundos realizada repetidamente durante un periodo de 6 días para evaluar el efecto de aprendizaje en el laberinto de agua;

La Fig. 4 es un gráfico que muestra los resultados de comparación entre un grupo control y grupos tratados con varias concentraciones de las fracciones activas del extracto de *Pulsatillae Radix* con respecto al efecto de las fracciones activas del extracto de *Pulsatillae Radix* mediante un funcionamiento defectuoso que mide el tiempo de latencia necesario para que los animales experimentales permanezcan en el cuadrante donde se colocó la plataforma de escape al séptimo día, el último día del aprendizaje en el laberinto de agua, después de eliminar la plataforma de escape para evaluar el efecto de aprendizaje en el laberinto de agua.

Ejemplos

Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención a la luz de los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1: Extracción de *Pulsatillae Radix* y sus fracciones

Dos kilogramos de *Pulsatillae Radix* triturada se sometieron a extracción a reflujo en 14 l de etanol al 50 % durante aproximadamente 4 horas y el proceso entero se repitió una vez. El extracto se filtró y después se concentró a presión reducida a 50 °C usando un evaporador rotatorio. El concentrado resultante se suspendió en agua de modo que el volumen resultante se convierte en aproximadamente 5 veces (v/p) el de la hierba original *Pulsatillae Radix*. Después se introdujo en un embudo de separación después de mezclar con n-butanol saturado en agua y después se agitó durante aproximadamente 24 horas y se dejó que generara separación de capas. La capa de butanol de la parte superior se recogió, se volvió a fraccionar 2 – 3 veces adicionalmente y la capa de butanol y la capa restante se concentraron usando un evaporador rotatorio. Después, el resultante se secó eliminando el disolvente restante completamente en el horno de vacío. Cada una de las fracciones resultantes se convirtió en polvo y se almacenó a -20 °C hasta que se usó.

Ejemplo 2: Preparación de subfracciones de fracciones de *Pulsatillae Radix*

Las fracciones en n-butanol obtenidas en el ejemplo 1 se sometieron a cromatografía en columna usando resina de octadecil sílice (YMC*GEL ODS-A 12nm, S-150 m). La resina usada fue de 500 g, aproximadamente 25 veces el peso de una muestra, y para usar el disolvente se seleccionó un método de gradiente por etapas; es decir, la cantidad de metanol en el disolvente se incrementó gradualmente al índice del 10 % (v/v) comenzando con la solución en metanol al 10 % (v/v) inicial hasta aproximadamente 2 a 3 veces el volumen de la resina. Como resultado se obtuvo un total de 10 fracciones, que se concentraron usando un evaporador rotatorio y se secaron en horno de vacío eliminando todo el disolvente restante. Las 10 fracciones anteriores se almacenaron a -20 °C hasta que se usaron.

Ejemplo 3: Método de medición de la tasa de inhibición de la neurotoxicidad inducida por beta-amiloide

El extracto de *Pulsatillae Radix* y sus fracciones en n-butanol obtenidas del ejemplo 1, y 10 fracciones obtenidas del ejemplo 2 se disolvieron en una solución de etanol al 50 %, se diluyeron en medio de cultivo celular MEM- α hasta

una concentración de 20 µg/ml y 4 µg/ml, respectivamente, y después cada célula se trató previamente usando 50 µl (se confirmó que no había efecto del vehículo sobre las células con la concentración final de EtOH del 0,5 %). Las células usadas fueron líneas celulares de neuroblastoma humano SK-N-SH y se dividieron en una placa de 96 pocillos con una concentración de 5×10^3 , en la que cada grupo se cargó en 3 pocillos, respectivamente. Después de 2 horas, se trató a las células con beta-amiloide, que se disolvió en 100 % de DMSO hasta una concentración final de 40 µM y posteriormente se cultivaron en un incubador con 5 % de CO₂ a 37 °C durante 48 horas. Tras la finalización del cultivo anterior, se trató a las células con 25 µl de la solución de MTT (5 mg/ml en PBS) y se cultivaron de nuevo durante 4 horas de forma que MTT pudiera formar formazán en las células para medir su viabilidad. Después, el medio de cultivo celular se eliminó y las células se lisaron con 100 % de DMSO y se midió la absorbancia UV a 550 nm mediante un ELISA. El grupo no tratado con beta-amiloide o cualquier otro fármaco se asignó como control. La toxicidad celular inducida por beta-amiloide se indicó en términos de beta-amiloide (%) basándose en el grupo control, cuya viabilidad celular se fijó en el 100 %. Los resultados de la viabilidad celular (%) debida a las fracciones anteriores se muestran en la Tabla 1 siguiente, en la que cada valor representa, respectivamente, el valor medio de estas células en 3 pocillos.

Tabla 1

Clasificación	Conc. (µg/ml)	Tasa de inhibición (%)
Extracto de EtOH al 50 %	20	78,4
	4	67,2
Fracción de n-BuOH:	20	80,5
	4	67,7
Fracción de MeOH al 10 %	20	71,4
	4	66,7
Fracción de MeOH al 20 %	20	69,2
	4	67,4
Fracción de MeOH al 30 %	20	68,9
	4	67,8
Fracción de MeOH al 40 %	20	74,1
	4	68,1
Fracción de MeOH al 50 %	20	71,2
	4	68,8
Fracción de MeOH al 60 %	20	79,2
	4	75,4
Fracción de MeOH al 70 %	20	83,6
	4	79,8
Fracción de MeOH al 80 %	20	81,1
	4	79,2
Fracción de MeOH al 90 %	20	11,6
	4	52,3
Fracción de MeOH al 100 %	20	51,6
	4	62,3
Vehículo	20	68,5

De acuerdo con la Tabla 1 anterior, la viabilidad celular de la línea celular SK-N-SH a una concentración de 20 µg/ml tratada con extracto en etanol al 50 % y la fracción en n-butanol, respectivamente, fue del 78,4 % y 80,5 %, respectivamente, en comparación con la viabilidad celular normal de las células inducidas por beta-amiloide del 68,5 %, mostrándose de este modo un nivel significativo de diferencia. En el caso de las células tratadas con la fracción de la solución en metanol al 60 %, 70 % and 80 %, todas las viabilidades también mejoraron al 79,2 %, 83,6 % y 81,1 %, respectivamente, mostrándose de este modo que sus efectos de inhibición alta previenen la neurotoxicidad inducida por beta-amiloide. En la Tabla 1, la actividad inhibitora más alta se observó en las células tratadas con la fracción de solución de metanol al 70 %, en la que la tasa inhibitora fue del 83,6 % (20 µg/ml) y 79,8 % (4 µg/ml), respectivamente, mostrándose de este modo que las células tienen la actividad inhibitora más alta contra la

neurotoxicidad inducida por beta-amiloide.

Ejemplo 4: Medición de la tasa de inhibición de la neurotoxicidad inducida por peróxido de hidrógeno

Con el fin de estudiar el efecto inhibitor de la fracción de solución de metanol al 70 % obtenida en el ejemplo 2 sobre la toxicidad inducida por oxígenos activos, se trató a las células con peróxido de hidrógeno hasta la concentración de 250 mM para inducir toxicidad celular y se procesó después del siguiente modo.

Las células usadas fueron líneas celulares de neuroblastoma HT22 y se dividieron en una placa de 96 pocillos con una concentración de 5×10^3 , en la que cada grupo se cargó en 3 pocillos, respectivamente. Las células se dividieron en un grupo control y el grupo tratado y se trataron con las fracciones activas hasta una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, se cultivaron durante 48 horas, se trataron con la solución MTT (5 mg/ml en PBS) para solubilizar y se midió la DO (A570/A630). El grupo no tratado con peróxido de hidrógeno o cualquier otro fármaco se asignó como control. La toxicidad celular inducida por peróxido de hidrógeno se indicó en términos de peróxido de hidrógeno (%) basándose en el grupo control, cuya viabilidad celular se fijó en el 100 %. Los resultados de la viabilidad celular (%) debida a las fracciones anteriores se muestran en la Tabla 2 siguiente, en la que cada valor representa, respectivamente, el valor medio de las células en 3 pocillos.

Tabla 2

Clasificación	Tasa de inhibición (%)			
	Control	Peróxido de hidrógeno	Fracción de solución de MeOH al 70 %	
			10 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
1 ^{er} ensayo	101,8	79,9	93,3	92,4
2 ^o ensayo	99,4	77,1	77,4	83,5
3 ^{er} ensayo	98,8	88,7	91,8	99,7
Promedio	100,0	81,9	87,5	91,9
Desviación típica	1,3	4,9	7,1	6,6

Con los datos de la Tabla 2, se demostró claramente que la fracción de la solución de metanol al 70 % redujo la toxicidad celular inducida por peróxido de hidrógeno en la línea celular HT22, lo que demuestra que la fracción anterior tiene actividad antioxidante.

Ejemplo 5: Medición de la tasa de inhibición contra la apoptosis inducida por estaurosporina

Dado que el efecto inhibitor de la fracción de la solución de metanol al 70 % sobre la toxicidad inducida por oxígeno activo se estudió en el ejemplo 4, se estudió una toxicidad celular similar tratando las células HT22 con estaurosporina, que se sabe que afecta a la vía de la proteína C quinasa, hasta una concentración final de 1 mM y el experimento se realizó del siguiente modo:

Las células se dividieron en una placa de 96 pocillos con una concentración de 5×10^3 , en la que cada grupo se cargó en 3 pocillos, respectivamente. Las células se dividieron en un grupo control y el grupo tratado y se trataron con las fracciones activas hasta una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, se cultivaron durante 48 horas, se trataron con la solución MTT (5 mg/ml en PBS) para solubilizarse y después se midió la DO (A570/A630). El grupo no tratado con estaurosporina o cualquier otro fármaco se asignó como control. La toxicidad celular inducida por estaurosporina se indicó en términos de estaurosporina (%) basándose en el grupo control, cuya viabilidad celular se fijó en el 100 %. Los resultados de la viabilidad celular (%) debidos a las fracciones anteriores se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Clasificación	Tasa de inhibición (%)			
	Control	Estaurosporina	Fracción de solución de MeOH al 70 %	
			10 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
1 ^{er} ensayo	101,8	71,3	71,6	78,4
2 ^o ensayo	99,4	72,9	71,3	79,9
3 ^{er} ensayo	98,8	71,6	72,6	78,4
Promedio	100,0	72	71,8	78,9
Desviación típica	1,3	0,7	0,5	0,7

En la Tabla 3 anterior, se demostró claramente que la fracción de la solución de metanol al 70 % reduce la toxicidad celular inducida por estaurosporina en la línea celular HT22, lo que demuestra que la fracción anterior tiene actividad

antioxidante.

Ejemplo 6: Efecto de proliferación celular

5 Dado que se demostró que la fracción de la solución de metanol al 70 % tenía varios efectos sobre las neuronas, se realizó un experimento para estudiar si su fracción activa también tiene una actividad de proliferación de neuronas del siguiente modo.

10 Las células de la línea celular HT22 se dividieron en una placa de 96 pocillos con una concentración de 5×10^3 , en la que cada grupo se cargó en 3 pocillos, respectivamente. Las células se dividieron en un grupo control y el grupo tratado y se trataron con las fracciones activas hasta una concentración de 10 µg/ml y 100 µg/ml, respectivamente, se cultivaron durante 48 horas, se trataron con la solución MTT (5 mg/ml en PBS) para solubilizarse y después se midió la DO (A570/A630). El grupo no tratado con los fármacos se asignó como control, en el que la viabilidad celular de un grupo control se fijó en el 100 %. Los resultados de la viabilidad celular (%) debidos a las fracciones anteriores se muestran en la Tabla 4 a continuación.

15

Tabla 4

Clasificación	Tasa de inhibición (%)		
	Control	Fracción de solución de MeOH al 70 %	
		10 µg/ml	100 µg/ml
1 ^{er} ensayo	101,8	104,6	116,8
2 ^o ensayo	99,4	101,2	111,3
3 ^{er} ensayo	98,8	103,0	108,2
Promedio	100,0	102,9	112,1
Desviación típica	1,3	1,4	3,5

A partir de la Tabla 4 se muestra claramente que la fracción de la solución de metanol al 70 % tiene la actividad de proliferación celular en la línea celular HT22.

20 **Ejemplo 7: Incremento de la actividad α-Secretasa**

25 El beta-amiloide, una causa principal de demencia, se produce procesando la proteína precursora del amiloide (APP) mediante (-secretasa. En condiciones normales, la APP se procesa en sAPP(a través de la (-secretasa. El beta-amiloide induce toxicidad, que conduce a apoptosis de las neuronas mientras que sAPP(- tiene actividades neurotróficas tales como actividad de proliferación de neuronas. Por tanto, la actividad de la (-secretasa es muy importante en la prevención y el tratamiento de la demencia.

30 Para estudiar el efecto de la fracción de la solución de metanol al 70 % obtenida en el ejemplo 2 sobre el proceso del APP mencionado anteriormente, se realizó un experimento del siguiente modo usando la línea celular W4 que produce grandes cantidades de APP.

35 Las células de la línea celular W4 se trataron con la fracción de la solución de metanol al 70 % y después se cultivaron durante aproximadamente 12 horas. Después, el cultivo se concentró con TCA, se sometió a transferencia de tipo Western y las bandas resultantes se cuantificaron mediante densitometría y se midió la cantidad de sAPP(. El sAPP(es un producto generado como resultado de la proteólisis del APP mediante (-secretasa y la cantidad de sAPP(generada indirectamente indica la actividad de (-secretasa. El control positivo en este experimento fue un cultivo celular tratado con forbol 12,13-dibutirato (PDBu), un agente inductor de la actividad de la (-secretasa, hasta una concentración final de 1 mM, que se usó después de la concentración. La actividad de la (-secretasa se calcula comparando la cantidad de sAPP(en varios grupos con la cantidad de sAPP(en el cultivo celular sin tratar.

40

Tabla 5

Clasificación	Densidad relativa			
	Control negativo	Fracción de solución de metanol al 70 %		Control positivo (PDBu)
		10 µg/ml	100 µg/ml	
1 ^{er} ensayo	62,9	129,6	148,4	226,5
2 ^o ensayo	99,6	257,7	274,4	314,1
3 ^{er} ensayo	137,5	239,2	161,8	327,2
Promedio	100,0	208,8	194,9	289,3
Desviación típica	30,5	56,5	56,5	44,7

En la Tabla 5 se muestra claramente que la fracción de la solución de metanol al 70 % aumenta la actividad de la α-

secretasa en la línea celular W4. El incremento de la actividad de la α -secretasa y el posterior incremento de la cantidad de sAPP α sugiere que la producción de beta-amiloide, el material inductor de la demencia, se reduce.

Ejemplo 8: Ensayo de evitación pasiva

5 De acuerdo con el resultado anterior, el extracto de *Pulsatillae Radix* y sus fracciones activas suprimen la toxicidad celular inducida por beta-amiloide *in vitro* y, por tanto, cabe esperar que alivien los síntomas de enfermedad de Alzheimer, un tipo de demencia que se sabe que está producida por neurotoxicidad inducida por beta-amiloide. Para identificar adicionalmente el efecto del extracto de *Pulsatillae Radix* y sus fracciones *in vivo* sobre la mejora del deterioro de la memoria, uno de los principales síntomas de demencia, se realizó un ensayo de evitación pasiva usando el extracto de *Pulsatillae Radix* y sus fracciones, obtenido en los Ejemplos 1 y 2 del siguiente modo.

15 El dispositivo experimental usado fue una caja de escape de 50 cm (W) x 15 cm (L) x 40 cm (H). La caja de escape estaba dividida en dos estancias por una puerta de guillotina, en la que una estancia era una estancia iluminada que disponía de iluminación mientras que la otra estancia era una estancia oscura cubierta completamente con un paño negro, de modo que se permite la diferencia en el efecto de iluminación.

20 En primer lugar, la rata se introdujo en la estancia iluminada y la puerta de guillotina se abrió con la luz encendida. Después, la rata entró en la estancia oscura en 20 segundos para buscar un lugar oscuro por instinto y en cuanto la rata entró en la estancia oscura, se cerró la puerta de guillotina. Como se ha descrito anteriormente, se midió el tiempo que tardó la rata en ir desde la estancia iluminada a la estancia oscura (en lo sucesivo en el presente documento denominado "tiempo de latencia") y todas las ratas participantes en este experimento se entrenaron mediante un ensayo de entrenamiento para entrar en la estancia oscura en 20 segundos el primer día del experimento. Al día siguiente, las anteriores ratas entrenadas se introdujeron de nuevo en la estancia iluminada con la luz encendida y se dejó que entraran en la estancia oscura. Aquí, las ratas fueron sometidas a un shock eléctrico de 0,8 mA durante 3 segundos mediante una rejilla electrónica instalada en el fondo de la estancia.

30 Veinticuatro horas después del ensayo de adquisición anterior, se introdujo de nuevo a las ratas en la estancia iluminada con la luz y se dejó que entraran en la estancia oscura. Aquí, las ratas normales dudaron si entrar en la estancia oscura al recordar el shock eléctrico del día anterior. El tiempo de latencia se midió fijando el tiempo de latencia máximo en 300 segundos.

35 En el experimento anterior, el efecto del extracto de *Pulsatillae Radix* y sus fracciones sobre la mejora del deterioro de memoria se observó midiendo el nivel de mejora de la memoria para un grupo experimental tratado con escopolamina (1 mg/ml), un fármaco que se sabe que reduce la memoria inhibiendo la transmisión de un neurotransmisor, y después tratado con un extracto de *Pulsatillae Radix* 1 hora después del tratamiento con escopolamina, en el que un grupo control no tratado con escopolamina o cualquier otro fármaco se fijó en un 100 % y un grupo tratado con escopolamina (1 mg/ml) se fijó en el 0 %.

40 Como resultado, se demostró que el extracto de *Pulsatillae Radix* y sus fracciones tienen la actividad de prevenir el deterioro de la memoria causado por la escopolamina, que impide la transmisión de acetilcolina en el cerebro (Fig.2).

45 Cuando se administró tacrina por vía oral como fármaco control en la cantidad de 30 mg/l, tuvo como resultado la prevención del deterioro de la memoria en un 35 %. Cuando el extracto de *Pulsatillae Radix* obtenido en el ejemplo 1 y sus fracciones en butanol se administraron por vía oral en la cantidad de 200 mg/l, tuvo como resultado actividades del 31,9 % y 35,2 %, respectivamente. Cuando las fracciones de la solución de metanol al 60 %, 70 % y 80 % del extracto de *Pulsatillae Radix* obtenido en el ejemplo 2 se administraron por vía oral en la cantidad de 100 mg/l, tuvo como resultado actividades con un significado del 39,4 %, 48,6 % y 41,8, respectivamente. Cuando la fracción de la solución de metanol al 70 % del extracto de *Pulsatillae Radix* obtenido en el ejemplo 2 se administró por vía oral en la cantidad de 150 mg/l, tuvo como resultado una actividad con un significado del 57,1 %.

A partir de los resultados anteriores, es evidente que el extracto de *Pulsatillae Radix* y sus fracciones pueden mejorar la memoria disminuida observada como síntomas de demencia y DCL.

Ejemplo 9: Ensayo del laberinto de agua

60 Además del experimento anterior que confirma que el extracto de *Pulsatillae Radix* y sus fracciones pueden mejorar la memoria disminuida se realizó un ensayo del laberinto en agua para estudiar el efecto del extracto de *Pulsatillae Radix* y sus fracciones sobre la mejora de la capacidad de aprendizaje y el deterioro de la memoria a largo plazo.

65 Se anestesió a las ratas experimentales con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) y después se les inyectó en el septo medial (AP: -0,2, L: \pm 0,3, H: -6,2) 1 μ g de ¹⁹²saporina usando la técnica estereotáxica. Desde el día siguiente se administró a las ratas todos los días la fracción de la solución de metanol al 70 % obtenida en el ejemplo 2, que se preparó en carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5 % en la cantidad de 50, 100 and 200 mg/kg, respectivamente, a los grupos experimentales usando un inyector esterilizado de acero inoxidable para ratas durante un periodo de 3 semanas. El tanque de agua cilíndrico con una altura de 50 cm usado como laberinto de agua en este experimento

se llenó con agua a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ hasta 30 cm de altura y los equipos espaciales necesarios, tales como cámara de video, mesa de laboratorio, dispositivo de control de la temperatura del agua en la mesa de laboratorio y similares se mantuvieron en localizaciones habituales. Se instaló la plataforma de escape en un acrílico circular transparente con un diámetro de 12 cm y se colocó 1,5 cm por debajo del nivel del agua. El laberinto de agua estaba compuesto por 4 cuadrantes iguales de noreste (NE), noroeste (NO), sureste (SE) y suroeste (SO). La plataforma se colocó en el centro del cuadrante NE y uno de los cuadrantes restantes se usó como punto de partida. Además, se entrenó a las ratas 4 veces al día durante 7 días. Una vez finalizado el último ensayo de entrenamiento el 7^a día, se colocó a las ratas en un ensayo de prueba de natación libre en el que se dejó que las ratas nadaran libremente durante aproximadamente 60 segundos sin la plataforma. Los comportamientos de las ratas experimentales se grabaron en video. En el ensayo de entrenamiento, se midió el tiempo necesario para que las ratas alcanzaran la plataforma mientras que en el ensayo de prueba durante 60 segundos, se midió el tiempo que permanecieron en el cuadrante cuando se colocó la plataforma.

En la función de adquisición que midió el tiempo de latencia hasta alcanzar la plataforma en 180 segundos realizada durante 6 días, el 1er día del aprendizaje en el laberinto de agua, el tiempo de latencia fue $144,3 \pm 7,2$ segundos para un grupo control, $154,9 \pm 9,4$ segundos para un grupo tratado con la fracción de la solución de metanol al 70 % (50 mg/kg) en el Ejemplo 2, $130,8 \pm 21,7$ segundos para un grupo tratado con la fracción de la solución de metanol al 70 % (100 mg/kg) en el Ejemplo 2, y $135,8 \pm 11,9$ segundos para un grupo tratado con la fracción de la solución de metanol al 70 % (200 mg/kg) en el Ejemplo 2, mostrándose de este modo la ausencia de una diferencia significativa entre los grupos. No obstante, mediante una inspección posterior, se halló, en el 2^o día del aprendizaje en el laberinto con agua, que el tiempo de latencia para el grupo tratado con la fracción de solución de metanol al 70 % (200 mg/kg) en el ejemplo 2 fue $78,1 \pm 23,0$ segundos, mostrándose de este modo un nivel significativo de diferencia en comparación con el de un grupo control ($P < 0,05$) (Fig. 3).

Adicionalmente, en el rendimiento defectuoso realizado al 7^o día cuando se midió el tiempo de retención en el cuadrante en el que se localizaba la plataforma tras la eliminación de la plataforma, se produjo un nivel significativo de diferencia observado entre los grupos: Es decir, el tiempo de retención fue $21,8 \pm 1,8$ % para un grupo control, $29,6 \pm 3,4$ % para un grupo tratado con la fracción de la solución de metanol al 70 % (50 mg/kg) en el Ejemplo 2, $32,1 \pm 4,7$ % para un grupo tratado con la fracción de la solución de metanol al 70 % (100 mg/kg) en el Ejemplo 2, y $38,8 \pm 7,6$ % para un grupo tratado con la fracción de la solución de metanol al 70 % (200 mg/kg) en el Ejemplo 2 ($P < 0,05$) (Fig. 4). Por tanto, es evidente que las fracciones activas del extracto de *Pulsatillae Radix* pueden mejorar el aprendizaje espacial y la capacidad de memoria.

Como se ha indicado anteriormente, está claro que las fracciones activas del extracto de *Pulsatillae Radix* tienen efectos de mejora de la capacidad disminuida de la memoria y la capacidad disminuida de aprendizaje que se observan como síntomas principales en la demencia y DCL.

Ejemplo 10: Ensayo de toxicidad

Para estudiar la toxicidad de una única administración oral de las fracciones activas del extracto de *Pulsatillae Radix* a 5 ratas Sprague-Dawley (SD) de cada sexo, se administró, respectivamente, un material de ensayo en la cantidad de 2.000 mg/kg y 1.000 mg/kg, mientras que al grupo control se le administró excipiente. Después se observó a las ratas durante dos semanas con respecto a la mortalidad, síntomas generales, cambios del peso corporal y hallazgos en la autopsia. El resultado mostró que todas las ratas sobrevivían y, además, que no se observaban síntomas anormales observados en las ratas en relación con la administración del material de ensayo. Además, no se observaron síntomas anormales en el peso corporal y los hallazgos de la autopsia en relación con la administración del material de ensayo. A partir de los resultados anteriores que muestran que no se observaron mortalidad o síntomas anormales, cambios en el peso corporal y hallazgos en la autopsia debidos a la administración del material de ensayo, se concluyó que la dosis letal mínima supera los 2.000 mg/kg en ratas SD tanto macho como hembra. Adicionalmente se realizó un experimento en los grupos de ratas SD mediante administración oral de una única dosis de fracciones activas del extracto de *Pulsatillae Radix* en la cantidad de 2.000 mg/kg, 1.000 mg/kg, 500 mg/kg, y 100 mg/kg, respectivamente, a cada grupo, y el resultado mostró que no se observaban síntomas anormales o mortalidad, cambios en el peso corporal y hallazgos en la autopsia mediante la administración del material de ensayo.

Ejemplo de preparación 1: Fabricación de polvo y cápsulas

Se mezclaron cien miligramos del extracto de *Pulsatillae Radix* (o sus fracciones activas) con 14,8 mg de lactosa, 3 mg de celulosa cristalina y 0,2 mg de estearato de magnesio. La mezcla se cargó en cápsulas de gelatina n^o 5 usando un dispositivo adecuado.

Ejemplo de preparación 2: Fabricación de inyecciones

Se mezclaron cincuenta miligramos del extracto de *Pulsatillae Radix* (o sus fracciones activas) con 180 mg de manitol, 26 mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, y 2.974 mg de agua destilada. La mezcla se cargó en una botella y se esterilizó calentando a 20°C durante 30 minutos.

Ejemplo de preparación 3: Fabricación de alimentos saludables

5 Se fabricaron alimentos saludables basándose en una administración diaria mezclando 0,3 mg del extracto de *Pulsatillae Radix* (o sus fracciones activas) con vitamina E en polvo, lactato ferroso, cinc oxidado, amida de ácido nicotínico, vitamina A y vitamina B1 y B2.

La composición de los alimentos saludables anteriores es la siguiente (dosis diaria por persona):

Ingrediente activo	300 mg
Extracto de Ginseng	100 mg
Extracto de té verde	100 mg
Vitamina C	100 mg
Vitamina E en polvo	120 mg
Lactato ferroso	2 mg
Cinc oxidado	2 mg
Amida de ácido nicotínico	20 mg
Vitamina A	5 mg
Vitamina B1	2 mg
Vitamina B2	2 mg
Almidón de maíz	200 mg
Estearato de magnesio	20 mg

10 Como se ha indicado anteriormente, el extracto de *Pulsatillae Radix* y sus fracciones activas pueden prevenir la neurotoxicidad inducida por beta-amiloide y tienen efectos de inhibición de la generación de beta-amiloide, actividad antioxidante, proliferación de neuronas, mejora de las capacidades de aprendizaje y memoria, por lo que cabe esperar que sean útiles para tratar el deterioro cognitivo leve (DCL) y la demencia, y se pueden usar para fabricar

15 fármacos para mejorar las funciones cerebrales así como alimentos saludables.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que contiene extracto de *Pulsatillae Radix* para usar en la inhibición de la formación de beta-amiloide o en la inhibición de la neurotoxicidad inducida por beta-amiloide en la prevención y el tratamiento del deterioro cognitivo leve y la demencia.
2. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho *Pulsatillae Radix* comprende *Pulsatilla chinensis*, *Pulsatilla koreana*, *Pulsatilla cernua*, *Pulsatilla patens* o plantas del mismo género.
- 10 3. Un método de preparación de una fracción activa, que comprende:
(a) obtener un extracto de alcohol de *Pulsatillae Radix* usando un alcohol C₁ - C₆;
(b) obtener una fracción de alcohol concentrando dicho extracto de alcohol a presión reducida, seguido de separación de capas usando un alcohol de grado bajo saturado en agua seleccionado de propanol y butanol; y
(c) obtener una fracción activa de dicha fracción de alcohol purificando mediante cromatografía en columna.
- 15 4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el disolvente de elución usado en la purificación mediante cromatografía en columna en dicho método es una solución de metanol al 60 – 80 %.
- 20 5. Un agente terapéutico para usar en la inhibición de la formación de beta-amiloide o en la inhibición de la neurotoxicidad inducida por beta-amiloide en el tratamiento y la prevención del deterioro cognitivo leve, en donde el agente terapéutico comprende los productos resultantes que pueden obtenerse mediante las etapas de extracción y de purificación de la reivindicación 3, respectivamente.
- 25 6. Un agente terapéutico para usar en la inhibición de la formación de beta-amiloide o en la inhibición de la neurotoxicidad inducida por beta-amiloide en el tratamiento y la prevención de la demencia, en donde el agente terapéutico comprende los productos resultantes que pueden obtenerse mediante las etapas de extracción y de purificación de la reivindicación 3, respectivamente.
- 30 7. Un alimento saludable para usar en la inhibición de la formación de beta-amiloide o en la inhibición de la neurotoxicidad inducida por beta-amiloide en la prevención y el tratamiento del deterioro cognitivo leve y de la demencia, en donde el alimento saludable contiene extracto de *Pulsatillae Radix*.
- 35 8. Un alimento saludable para usar en la inhibición de la formación de beta-amiloide o en la inhibición de la neurotoxicidad inducida por beta-amiloide en la prevención y el tratamiento del deterioro cognitivo leve y de la demencia, en donde el alimento saludable comprende los productos resultantes que pueden obtenerse mediante las etapas de extracción y de purificación de la reivindicación 3, respectivamente.

Fig. 1

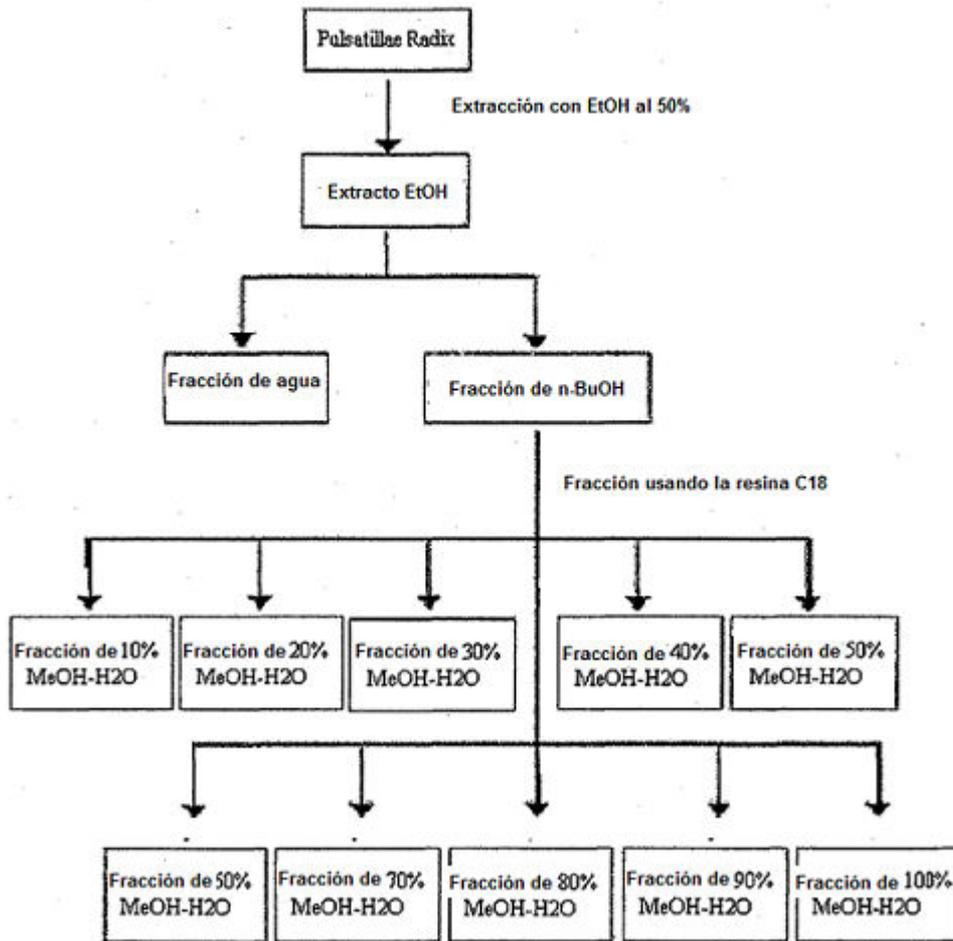


Fig. 2

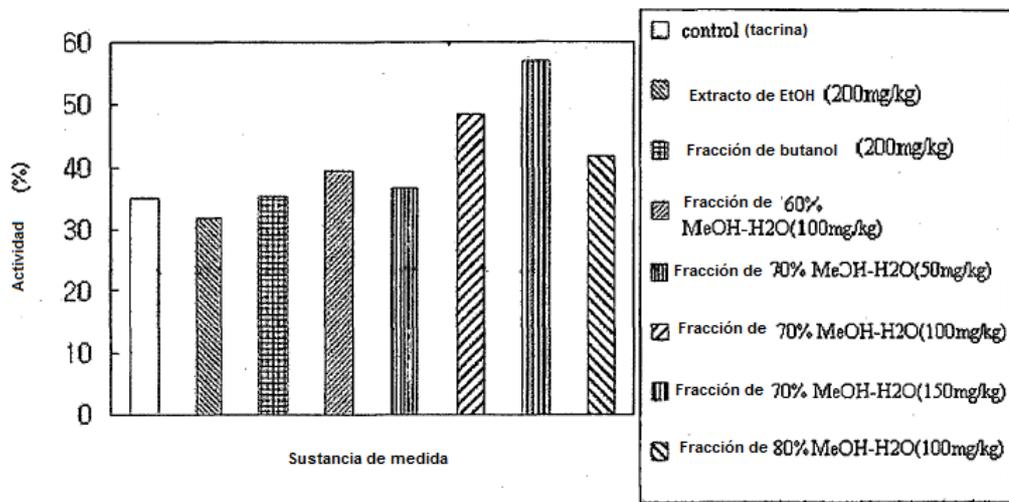


Fig. 3

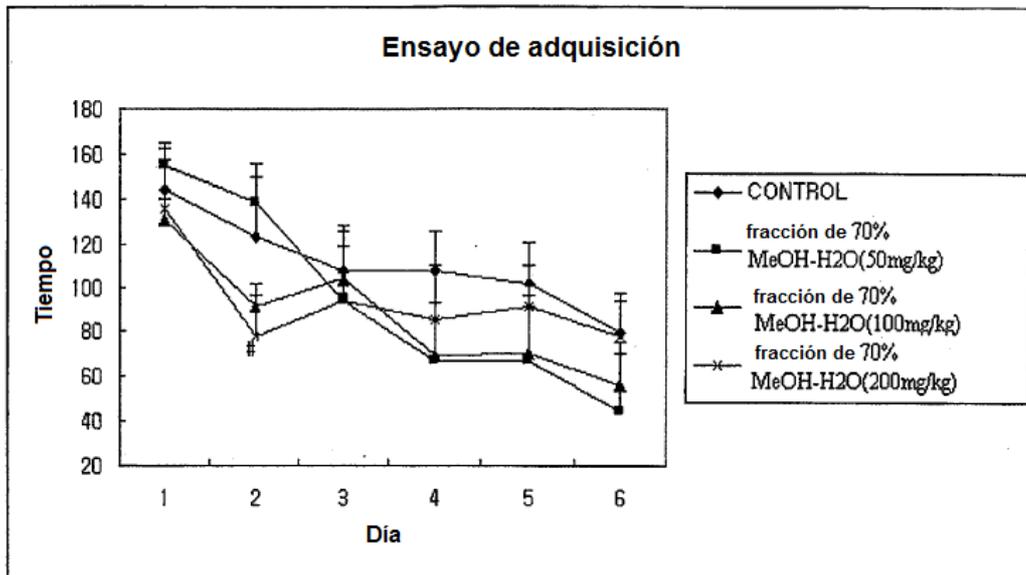


Fig. 4

