

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 248**

51 Int. Cl.:

A61K 36/185 (2006.01)

A61K 36/062 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2007** **E 07150338 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016** **EP 2072055**

54 Título: **Composición y método para la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.04.2016

73 Titular/es:

SUNWAY BIOTECH CO., LTD. (100.0%)
No. 139, Xing' ai Road., Neihu District
Taipei City 114, TW

72 Inventor/es:

PAN, TZU-MING y
LEE, CHUN-LIN

74 Agente/Representante:

DÍAZ NUÑEZ, Joaquín

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 568 248 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

Composición y método para la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

5 ANTECEDENTES DEL DESCUBRIMIENTO

1) ALCANCE DE LA INVESTIGACIÓN

[0001] Este descubrimiento es relativo a un compuesto químico y un método para prevenir y tratar la enfermedad de Alzheimer, en particular, a una formulación que utiliza monacolínicas, agentes antiinflamatorios y antioxidantes extraídos de la levadura roja de arroz (RMR) y
10 suministrada en diversas formas, como pastillas, cápsulas, polvos, bebidas, etc.

2) DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES

[0002] La enfermedad de Alzheimer (AD) está asociada con un fallo progresivo de las neuronas. La EA es una causa mayor de demencia, y en muchas ocasiones se usa
15 indistintamente cualquiera de los dos términos. En la enfermedad de Alzheimer (AD) hay una pérdida progresiva de las funciones cognitivas, emocionales y del lenguaje. Generalmente, los pacientes graves de EA necesitan un mayor cuidado y asistencia en todos los aspectos: higiene personal, alimentación, aseo, etc. Por tanto, los enfermos de EA causan un gran impacto en la vida diaria de sus familias. La pérdida de memoria es el síntoma más común de
20 la AD. Inicialmente, dicho síntoma puede pasarse por alto o ser atribuido a otras afecciones. Algunos de los otros síntomas afectan enormemente a la capacidad de una persona para llevar a cabo actividades diarias, incluyendo falta de orientación, dificultad para reconocer un sitio o a otras personas, poca o nula retención de memorias a corto plazo, fijación en memorias previas, o incapacidad para aprender cosas nuevas. A medida que la enfermedad progresa, los
25 pacientes tienen dificultad para expresarse o tomar decisiones. Gradualmente, los pacientes de EA dejan de reconocer a sus familiares. Algunos pacientes pueden mostrarse agitados, desconfiados, exhibir signos de paranoia o tendencias antisociales. Asimismo, los pacientes de EA sin supervisión pueden vagar sin rumbo por la calle o perderse de camino a casa. Nuevos estudios muestran que los pacientes de EA también resultan afectados en las áreas de visión y
30 percepción espacial, lo que les dificulta la orientación y la capacidad de distinguir una dirección concreta. Los pacientes de EA también tienen problemas de concentración, lo que les dificulta el poder realizar tareas mundanas de forma autosuficiente.

Otro daño a las células cerebrales de los pacientes de AD, como por ejemplo al prosencéfalo basal e hipocampo, pueden producir pérdida de memoria y confusión. Muchos pacientes de EA
35 suelen morir por otras causas no vinculadas directamente a dicha enfermedad, como por neumonía. Generalmente, los pacientes de EA pueden vivir de 6 a 8 años, aunque se han dado muchos casos en que los pacientes aún sobreviven tras 20 años.

[0003] La Administración de Comida y Drogas (FDA) de los EEUU ha aprobado cinco tratamientos farmacéuticos contra la enfermedad de Alzheimer en uso clínico, incluyendo inhibidores de la colinesterasa (incluyendo tacrina y donepezilo). La colinesterasa es una enzima que cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (AChE) en colina y ácido acético. Actualmente, los tratamientos farmacéuticos aprobados se utilizan para inhibir la colinesterasa y evitar la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (AChE). Ambos inhibidores pueden incrementar el contenido de AChE en el cerebro, posponiendo la pérdida de memoria y permitiendo así a los pacientes con EA llevar a cabo sus actividades rutinarias. Lo más importante es que dichos tratamientos son incapaces de curar la enfermedad de Alzheimer, sólo alivian sus síntomas. Además de esto, cabe recordar que las ya mencionadas medicaciones han demostrado tener algunos efectos secundarios en pacientes de AD, como por ejemplo náuseas, dolores de cabeza, diarrea, insomnio, dolor, alucinaciones, mareos, etc. Por tanto, dichas medicaciones no son tratamientos prácticos para la enfermedad de Alzheimer.

[0004] La presente situación exige investigar una forma efectiva de prevenir el desarrollo de la enfermedad y su cura en pacientes sin efectos secundarios relevantes.

RESUMEN DEL DESCUBRIMIENTO

[0005] En vista de los inconvenientes ya mencionados, el descubrimiento provee una formulación para usar en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con la reivindicación 1

[0006] Otro objetivo del mismo es proveer de un compuesto que pueda usarse para prevenir y tratar la enfermedad de Alzheimer sin producir efectos secundarios de relieve a los enfermos de AD.

[0007] El descubrimiento en lo que respecta a otros aspectos se halla en un compuesto para usar en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Dicho compuesto incluye monacolininas, agentes antiinflamatorios y antioxidantes que previenen y tratan el Alzheimer suministrados en forma de pastillas, cápsulas, polvo, bebida, etc.

La fórmula del compuesto, que incluye las ya mencionadas sustancias, se usa para la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En una formulación ideal, la dosis efectiva de monacolininas es como mínimo mayor a 100 µg, la dosis mínima efectiva de antioxidantes es mayor a 40 µg y la de agentes antiinflamatorios es mayor a 10 µg; la relación de peso óptima entre monacolininas, agentes antiinflamatorios y antioxidantes es de 40:2:1,

permitiendo al compuesto alcanzar los objetivos de prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer sin causar efectos secundarios a los pacientes de AD.

5 [0008] Una descripción detallada se da en las siguientes realizaciones con referencia a los dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIAGRAMAS

[0009]

La Fig. 1 es una posible vista de un aparato de acuerdo a los ensayos.

10 La Fig. 2 es una gráfica estadística mostrando el efecto de RMR en la latencia de paso de ratas de una cámara iluminada a una cámara oscura en un ensayo múltiple.

Las Figs. 3-1 y 3-2 muestran vistas en perspectiva de un laberinto de agua de acuerdo con los ensayos.

15 Las Figs. 4-A, 4-B y 4-C muestran diagramas de influencia en relación con los efectos de RMR en la conducta de la memoria y habilidades de aprendizaje de ratas con infusión A β 40 en pruebas de entreno de referencia de tareas de memoria y de test de prueba;

La Fig. 5 es una gráfica mostrando el efecto de RMR en el funcionamiento de la memoria y capacidad de aprendizaje de las ratas bajo los efectos de A β 40 en las pruebas de memoria.

20 La Fig. 6 es un diagrama de influencia mostrando el efecto de los RMR en la actividad de la acetilcolinoesterasa (AChE) en el hipocampo y córtex de las ratas bajo los efectos del A β 40.

La Fig. 7 es un diagrama esquemático que muestra el efecto del RMR en la actividad de formación del estado total de antioxidantes (TAS) en el hipocampo y córtex de las ratas bajo los efectos del A β 40.

25 La Fig. 8 es un diagrama de influencia que muestra el efecto del RMR en la actividad de formación del MDA en el hipocampo y córtex de las ratas bajo los efectos del A β 40.

La Fig. 9 es un diagrama de influencia que muestra el efecto del RMR en la actividad de formación del superóxido de dismutasa (SOD) en el hipocampo y córtex de las ratas bajo los efectos del A β 40.

30 Las Figs. 10-A y 10-B son diagramas que muestran los efectos del RMR en la formación de ROS en el hipocampo y córtex y la expresión de iNOS en las ratas bajo los efectos de A β 40.

La Fig. 11 es un diagrama que muestra el efecto del RMR en la acumulación de A β 40 en el hipocampo de las ratas bajo los efectos del A β 40.

Las Figs. 12-1 a 12-3 son diagramas de flujo que muestran el método para elaborar el compuesto para tratar y prevenir la EA en pacientes.

35

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

[0010] Para permitir una mejor comprensión de las características estructurales y los contenidos técnicos de este documento, la breve descripción de las ilustraciones está seguida
5 por una descripción detallada de las modalidades.

[0011] El resultado de la investigación que se presenta aquí es un compuesto que puede usarse para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer que no produce efectos secundarios relevantes. A continuación se describen algunos de los conceptos relativos a la investigación.
10 La agitación y la acumulación de amiloide β péptido ($A\beta$) son los agentes patógenos de la enfermedad de Alzheimer, que provocan déficit de neurotransmisores y deprimen la oxidación y respuesta inflamatoria del cerebro, resultando en el empeoramiento de la enfermedad en los pacientes de AD. $A\beta$ se forma después de la escisión secuencial de la proteína precursora de amiloide (APP) a través de α , β y γ -secretasa.

15 [0012] La formación de $A\beta$ se lleva a cabo por la escisión proteolítica del sitio de unión de los aminoácidos 671 y 672 realizado por la β -secretasa, así como la escisión de la unión 713 de los aminoácidos de APP realizado por la γ -secretasa. La escisión realizada por la secretasa produce no sólo fragmentos 1-40 y 1-42, sino también otros. La α -secretasa escinde la APP en
20 SAPP- α y fragmentos de p10. Sin embargo, dichos fragmentos de p10 pueden dividirse en p3, una parte de $A\beta$, y fragmentos de p7. Además, la escisión de APP producida por la β -secretasa resulta en la formación de sAPP β y fragmentos de p12, y hacen que dichos fragmentos de p12 se vuelvan a escindir en $A\beta$ y fragmentos de p7 por medio de la γ -secretasa (Evin et al. 2003; Shoji et al. 1992). La APP se divide en varios tipos de $A\beta$ por acción de la β - y
25 γ -secretasa. Sin embargo, la $A\beta$ sin neurotoxicidad se agrega como fibrillas con neurotoxicidad, que producen daños neuronales por desequilibrios en el ión calcio y estrés oxidativo. Las fibrillas $A\beta$ también rompen el crecimiento y la muerte celular de las neuritas por el aumento de la hiperfosforilación de la proteína tau. Además, las fibrillas $A\beta$ también se enlazan con el receptor específico en la membrana de las microglías y astrocitos, lo que causa la activación de
30 las microglías asociadas a la emisión de muchos factores neurotóxicos como los proinflamatorios IL-6, IL-1 y TNF- α , además de NO, ROS, y radicales libres. Actualmente, el gen de la apolipoproteína E en el 19º par de cromosomas se asocia con la patogénesis de la AD. ApoE se enlaza de forma fácil y rápida a las $A\beta$, lo que resulta en el depósito de placa senil relacionada con la neurotoxicidad.

35 [0013] Además, muchos documentos indican que hay una cierta relación entre las enfermedades cardiovasculares y el Alzheimer. Investigaciones realizadas por Martha et al.

centraron sus experimentos en ancianos de más de 65 años y obtuvieron como resultado que aquellos ancianos que ingerían grasas saturadas con su dieta eran propensos a sufrir enfermedades cardiovasculares, y muchos de ellos sufrían Alzheimer tras un promedio de 4 años después de haberseles diagnosticado su enfermedad cardiovascular. Por el contrario, 5 había una relación inversa si la dieta de los ancianos contenía abundantes grasas poliinsaturadas y monoinsaturadas (Freund-Levi et al. 2006). Muchas investigaciones han probado que hay una relación entre la producción de A β , que favorece la enfermedad de Alzheimer, y el metabolismo intracelular de lípidos (Frears et al. 1999; Kuo et al. 1998; Roher and Kuo 1999). Investigaciones recientes han demostrado que la A β se altera debido a la 10 distribución intracelular y esterificación del colesterol (Frears et al. 1999). La ApoE incrementa los niveles de colesterol en plasma y es uno de los factores de riesgo asociados con enfermedades cardiovasculares. El experimento (Puglielli et al. 2001) mostró que hay una relación directa entre la actividad de la acetilcolinoesterasa (AChE) y el contenido de colesterol ester (CE) en las células de rata (Puglielli et al. 2001; Zhao et al. 2005). Por tanto, queda 15 demostrado en estos experimentos que hay una relación directa entre las enfermedades cardiovasculares y la enfermedad de Alzheimer.

[0014] Consecuentemente, la composición de la invención se utiliza para disminuir la acumulación de A β en el cerebro y reducir las grasas saturadas que pueden contribuir a 20 enfermedades vasculares, para curar la enfermedad de Alzheimer

[0015] Recientemente, se han estado realizando múltiples investigaciones sobre la especie *Monascus*. En el futuro, el desarrollo de ingredientes y compuestos RMR puede convertirse en parte de dietas saludables con múltiples beneficios para la humanidad. La investigación prueba 25 que la monacolina K, el ácido γ -aminobutírico (GABA) y los compuestos antioxidantes en el RMR mejoran sustancialmente la probabilidad de prevenir y tratar la enfermedad de Alzheimer.

[0016] La Monacolina K es una lovastatina, una 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMGCoA) inhibidora de reductasa (estatina) para disminuir los niveles de colesterol, y está probado 30 clínicamente que disminuye los síntomas de enfermedades cardiovasculares (CAD). En años recientes, investigaciones epidemiológicas han concluído que la estatina tiene una gran efectividad clínica para tratar la enfermedad de Alzheimer. En la Base de datos de Investigación Médica General de Reino Unido, algunos informes médicos describen una asociación entre la terapia de estatina y la reducción de la incidencia de casos de la 35 enfermedad de Alzheimer hasta en un 70% (Jick et al. 2000). Investigaciones similares incluyen un experimento que se centró en pacientes de más de 60 años en tres hospitales de EEUU, basando su diagnóstico de EA en el estándar del Instituto Nacional de Transtornos

Neurológicos, Comunicativos e Ictus y en la Asociación de Enfermedad de Alzheimer y Transtornos Asociados (NINCDS-ADRDA). El experimento dividió a los enfermos de EA en tres grupos: el grupo A era un grupo de control, el grupo B fue tratado con estatinas, y el grupo C fue tratado con otras medicaciones para enfermedades cardiovasculares (incluyendo medicación para reducir la presión arterial). Los resultados del experimento mostraron que, sorprendentemente, el grupo de pacientes de EA tratados con estatinas provocaron que los indicadores de EA se redujeran hasta en un 70%, en los que la lovastatina y pravastatina obtuvieron los mejores resultados en los tratamientos (Wolozin et al. 2000).

10 [0017] Los agentes de transmisión de impulsos nerviosos, incluyendo nicotínicos, muscarínicos, serotoninas, los receptores de glutamato y el ácido γ -aminobutírico (GABA), la norepinefrina en el cerebro de pacientes con EA resultan perjudicados. Durante el proceso de envejecimiento, el volumen del cerebro humano se reduce un 10%, principalmente en la cantidad de neuronas del córtex cerebral, algunas áreas del cerebro reducirán su volumen en un 30-50%, y los neurotransmisores como AChE, GABA, catecolaminas, etc. también se reducen. En vista de lo mencionado, los pacientes con EA perderán gradualmente su capacidad cognitiva y memoria. Los síntomas de EA en sus fases iniciales incluyen déficit de memoria, confusión o dificultad para tomar decisiones. En fases posteriores, los pacientes presentan síntomas de trastorno del lenguaje, comportamientos anormales, espasmos, incapacidad para llevar a cabo sus actividades rutinarias (Mohr et al. 1994).

[0018] Cuando en las mitocondrias existe exceso de O_2 o H_2O_2 se forma OH como respuesta. Los radicales libres oxidantes permiten que A β forme A β insolubles, y empeoren los síntomas de la EA (Hsieh and Tai 2003). A partir de resultados experimentales, se deduce que los antioxidantes orales, por ejemplo en un comprimido con vitamina C y vitamina E, son capaces de aliviar eficazmente los síntomas de EA (Yallampalli et al. 1998; Yamada et al. 1999). Ceramida, un neurilema natural, se ha usado para reparar daño neuronal dirigido por A β and $FeSO_4$ en el hipocampo (Abousalham et al. 2002). En 1999, Aniya et al propusieron que la capacidad antioxidante del ácido dimérico en el *Monascus* es capaz de eliminar la inhibición de la LPO por $\cdot OH$, $\cdot O_2^-$, ferril-Mb y radicales peroxilo. El *Monascus* provee un electrón para que el óxido se oxide a un radical nitróxido, la posterior eliminación de radicales nitróxido producirá un efecto antioxidante (Taira et al. 2002). El efecto antioxidante del RMR es aplicable a la prevención de la enfermedad de Alzheimer, por lo que se puede mejorar el estado de los pacientes de EA sin que se agrave debido a la oxidación inducida por radicales libres.

35 [0019] Este descubrimiento fue publicado el 30 de julio de 2007 en el Journal of Neuroscience Research (Lee CL, Kuo TF, Wang JJ, Pan TM: La levadura roja de arroz alivia el deterioro de la

memoria y capacidad de aprendizaje en las ratas con infusión cerebral intraventricular evitando la acumulación de amiloide beta. *J Neurosci Res.* 2007, 85, 3171-3182). En el experimento publicado, se utilizaron ratas Wistar macho (de 8 semanas de edad y 250 gramos de peso) obtenidas del Laboratorio Central de Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Taiwán. Se las dividió en 7 ratas por grupo y se las mantuvo en una habitación con temperatura controlada ($23\pm 1^\circ\text{C}$) bajo un ciclo lumínico de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (luz encendida a las 8:00 y apagada a las 20:00), y se les dio libre acceso a comida y agua. Al alcanzar los 300 gramos de peso, se dividió a las ratas en grupos con infusión cerebral. La dieta diaria de RMR y la infusión de A β 40 se muestran en la Tabla 1. Las ratas se dividieron en varios grupos: 1) ratas con infusión de vehículo (grupo de vehículo), a las que se administró solución vehículo, 2) ratas con infusión A β 40 (grupo A β), a las que se suministró una solución con A β 40, 3) ratas con infusión A β 40 a las que se administró lovastatina (grupo LS), 4) ratas con infusión A β 40 y dosis simple de RMR (grupo RL) y 5) ratas con infusión A β 40 a las que se administró una dosis cinco veces superior a la anterior de RMR (grupo RH). La dosis de RMR se calculó de acuerdo a la fórmula de Boyd de área de superficie corporal tal y como recomienda la Administración de Alimentos y Drogas (Boyd 1935; Lee et al. 2006). Se estableció la dosis simple de RMR como 2 g para un adulto de 65 Kg de peso y una altura de 170cm. Se suministraron altas dosis de RMR al grupo RH, a los grupos LS y RL se les administró la misma dosis de lovastatina (1.43 mg/kg/día, por rata) para comparar los efectos entre suministrar simplemente la monacolina K y un compuesto de RMR que incluyera monacolininas, agentes anti-inflamatorios y compuestos antioxidantes para la prevención y tratamiento de la EA.

[0020] A las ratas se les inyectó una solución de A β 40 durante 28 días consecutivos en el cerebro para que desarrollaran la enfermedad de Alzheimer. Se usaron la misma dosis alimenticia diaria con productos de RMR y los mismos contenidos de lovastatina para determinar el efecto de la RMR contra la neurotoxicidad producida por A β y evaluar el efecto de la RMR en la memoria y capacidad de aprendizaje de las ratas. Los resultados del experimento muestran que la infusión de A β 40 durante 28 días consecutivos aumentó la actividad de las AChE, el contenido de las especies de oxígeno reactivas (ROS) y los niveles del peróxido de lípido (LPO), y al mismo tiempo redujo la capacidad total de antioxidantes (T-AOC) y superóxido de dismutasa (SOD). La dosis alimenticia de RMR redujo en gran medida el daño de la infusión de A β 40 al cerebro, y tuvo mejor efecto comparado con el grupo de lovastatina. Además, la infusión de A β 40 no pudo acumularse de forma considerable en el hipocampo por dificultar la oxidación y respuesta inflamatoria. Por primera vez se demostró que la levadura roja de arroz (RMR) tiene efecto en reducir los factores de riesgo de la demencia y déficit de

memoria en pacientes con EA, y los efectos son significativos comparados con el grupo de la lovastatina.

[0021] Se agruparon los animales y se planificó el calendario como se indica a continuación:

5 Tabla 1

Grupo	Infusión de A β	RMR (monacolina K) (mg/kg/día , por rata)	Lovastatina (mg/kg/día , por rata)
Vehículo	-	-	-
A β	+	-	-
LS	+	-	1.43
RL	+	151 (1.44)	-
RH	+	755 (7.20)	-

[0022] En referencia a la Fig. 1, el dispositivo (10) consistía en una cámara iluminada (11) y una cámara oscura (12), ambas del mismo tamaño. Se preparó una puerta de enlace (13) de 10x10 cm. para separar ambos compartimentos. Cuando la puerta de enlace (13) se abría, la cámara iluminada (11) y la cámara oscura (12) quedaban comunicadas. Diversos cables eléctricos (14) estaban dispuestos a intervalos de 1 cm en la base del compartimento oscuro, y producían descargas eléctricas cuando la puerta de enlace se cerraba. En cada prueba, se comenzaba colocando una rata en la cámara iluminada (11) y se abría la puerta (13). Después de que la rata entrase en el compartimento oscuro (12), se cerraba inmediatamente la puerta de enlace (13), se registraba el tiempo, y se suministraba una descarga eléctrica inevitable (100V, 0,3 mA, 2s) a través de los cables eléctricos (14). Tras 5s después de administrada la descarga, se extraía a la rata del compartimento oscuro. Si una rata no mostraba interés por entrar en el compartimento oscuro tras 300s, la rata era forzada a entrar en el mismo (12) y recibía la descarga por medio de los cables en el suelo (14) después de que se cerrara la puerta (13). Posteriormente, se volvía a colocar en la cámara iluminada (11) con la puerta (13) abierta, y se medía el intervalo de tiempo transcurrido hasta que abandonaba la cámara iluminada (11) en las pruebas de retención efectuadas 24 y 48 horas después de la prueba inicial. Si el tiempo que la rata permanecía en la cámara iluminada (11) era superior a los 300s, se consideraba que tanto su memoria como capacidad de aprendizaje eran normales y sin problemas.

[0023] La latencia de paso de una rata del compartimento iluminado (11) al compartimento oscuro (12) se usó como indicador para evaluar la memoria y capacidad de aprendizaje en la prueba de evasión pasiva. Como se muestra en la Fig. 2, en la primera prueba, todas las ratas se introducían en la cámara oscura (12) inmediatamente debido a la escototaxis, pero la descarga eléctrica en el compartimento oscuro (12) debería intimidarlas, de forma que las ratas con capacidad de aprendizaje y memoria normales evitaran introducirse en la cámara oscura (12) en posteriores ocasiones. Por tanto, la latencia de paso de cada grupo de ratas en el compartimento iluminado (11) tuvo mayores cambios en la segunda prueba. Los resultados de la segunda prueba indican claramente que las ratas con infusión de A β seguían permaneciendo menos tiempo en el compartimento iluminado que las ratas con infusión de vehículo. Sin embargo, los grupos RL y RH pasaban un tiempo más largo en la cámara iluminada que el grupo A β ($p < 0.05$). El efecto en el grupo de la lovastatina era menor que en el grupo RL con el mismo contenido de monacolina K, pero el rendimiento de la memoria y capacidad de aprendizaje del grupo de la lovastatina era significativamente mayor que el del grupo A β .

[0024] En referencia a la Fig. 3, se utilizó en la investigación un laberinto con agua (20) compuesto por un tanque circular (21) de 140cm. de diámetro y 45cm. de altura. Este laberinto de agua (20) tenía un dispositivo con una plataforma de escape móvil P1, de 12 centímetros de diámetro y 25 de altura, en el interior del tanque (21). Antes del experimento, el tanque circular (21) se dividía en cuatro cuadrantes (I, II, III y IV). Había cinco posiciones iniciales en el tanque (21) y se marcaba una posición equidistante desde el centro y el borde en la mitad de cada cuadrante como localización para la plataforma P1. Durante el experimento, se colocaba una cámara cenital para registrar las rutas de nado de las ratas.

[0025] La Fig. 4 muestra los efectos del RMR en el rendimiento de la memoria y capacidad de aprendizaje de las ratas con infusión de A β 40. El tiempo transcurrido desde que las ratas aparecen en el punto inicial del laberinto de agua hasta que encuentran la plataforma P1 se utiliza como indicador para evaluar la prueba de referencia de memoria. Los resultados muestran que el grupo con infusión de A β invierte siempre más tiempo que el grupo vehículo en encontrar la plataforma P1 de la segunda a la novena pruebas. La administración alimenticia de RMR en los grupos RL y RH hizo reducir significativamente los tiempos de la segunda a la novena pruebas en relación al grupo con infusión de A β ($p < 0.05$). La administración de lovastatina también produce tiempos más bajos que los del grupo A β , pero el efecto fue menor que en los grupos RL y RH. Los cambios en la longitud del itinerario de salida producido en las pruebas de entrenamiento en cada grupo de ratas mostraron una pauta similar a la de la

latencia de escape. Tampoco hubieron diferencias significativas en la velocidad de nado entre aquellos grupos de animales durante el transcurso de las pruebas de entrenamiento (los datos no se muestran) ($p>0.05$).

5 [0026] La prueba de referencia fue realizada inmediatamente tras la prueba de entrenamiento de la última prueba de referencia de memoria el día 24. La plataforma de escape P1 fue retirada del laberinto de agua (20). El tiempo que las ratas nadaban en el cuadrante original donde se ubicaba la plataforma de escape P1 se utilizó como indicador de referencia para evaluar la memoria y capacidad de aprendizaje. Los resultados presentados en la Fig 4-A
10 muestran que el grupo A β pasó menos tiempo buscando en el cuadrante objetivo que el grupo vehículo ($p<0.05$). La administración de RMR en la concentración habitual en el grupo RL o en una concentración cinco veces superior en el grupo RH resultan en un incremento significativo del tiempo de búsqueda en el cuadrante objetivo en un 38,2% ($p<0.05$) y un 48.0% ($p<0.01$) respectivamente, en relación al grupo A β , lo que sugiere que el incremento del tiempo de
15 búsqueda en los grupos RL y RH es debido a los efectos del RMR. Demuestra que la levadura roja de arroz es capaz de mejorar la memoria y capacidad de aprendizaje para los afectados por EA. La trayectoria de nado es útil para poder analizar la fiabilidad de la memoria y la capacidad de aprendizaje de las ratas en una prueba de percepción espacial. La Fig. 4-B indica claramente que las ratas con infusión A β buscan por el cuadrante sin dirección específica y alrededor del tanque circular (21). En cambio, las ratas con mejor memoria y capacidad de aprendizaje, como los grupos RL, RH y vehículo, nadaron directamente al cuadrante objetivo y estuvieron allí por más tiempo. Sin embargo, en todos los casos el grupo de la lovastatina sólo presentó mejoras ordinarias entre el grupo RL y el grupo A β en lo que respecta al deterioro de
20 la memoria y su capacidad de aprendizaje (Figs. 4-B y 4-C). La prueba de funcionamiento de la memoria es un método para evaluar la memoria a corto plazo y la capacidad de aprendizaje. En referencia en la Fig. 5, Las ratas bajo los efectos de A β son incapaces de reducir el tiempo de búsqueda de la plataforma P1 con respecto al grupo vehículo ($p<0.01$). Por el contrario, ambos grupos RL y RH son tan rápidos memorizando y aprendiendo como los del grupo vehículo en la prueba de memoria, y ambos redujeron significativamente la latencia de escape en un 57,3% y 58,9% en comparación al grupo A β ($p<0.01$). El grupo LS redujo significativamente la latencia de escape en un 26,7% comparada al grupo A β ($p<0.05$), pero el efecto fue inferior al mostrado en los grupos RL y RH ($p<0.05$).
30

[0027] El A β ha demostrado ser un factor de riesgo en el déficit de memoria y demencia en
35 pacientes de EA (Hashimoto et al. 2005; Stephan y Phillips 2005) y la infusión intracerebroventricular de A β 40 en el ventrículo lateral de las ratas ha probado ser un método adecuado para inducir un modelo de EA en animales (Stephan y Phillips 2005). Se han hecho

ensayos sobre capacidad de aprendizaje y déficit de memoria con el comportamiento de ratas con infusión de A β (Kar et al. 1998; Schubert et al. 1995; Townsend and Pratico 2005). Los radicales libres y ROS inducidos por la acumulación de A β dañaron las neuronas y enlaces sinápticos, y finalmente produjeron déficit de memoria y falta de capacidad de aprendizaje (Townsend y Pratico 2005). Por tanto, los antioxidantes y agentes antiinflamatorios han sido usados normalmente para intentar reducir estos factores de riesgo de la EA en el cerebro y aliviar el deterioro de la memoria y capacidad de aprendizaje (Chauhan et al. 2004; Cordle et al. 2005).

10 [0028] La prueba del laberinto de agua Morris se utiliza para evaluar la memoria y capacidad de aprendizaje, la prueba de memoria de referencia es un método para evaluar la memoria de largo plazo, y la prueba de la memoria de trabajo es un método para evaluar la memoria a corto plazo. De acuerdo a los resultados de las ya mencionadas pruebas de memoria y aprendizaje, las ratas con EA bajo los efectos de una dosis simple y quíntuple de RMR redujeron la latencia en las pruebas de memoria de referencia y de trabajo ($p < 0.05$). Además, las ratas con RMR en su dieta prolongaron su tiempo de búsqueda en el cuadrante objetivo en la prueba sonda. Los resultados del experimento mostraron claramente que las ratas con RMR en sus dietas son capaces de mejorar su memoria y capacidad de aprendizaje para reducir el tiempo de búsqueda de la salida en el laberinto de agua. Por el contrario, las ratas sin RMR en su dieta buscaron en todo el laberinto de agua sin ninguna dirección clara y necesitaron invertir más tiempo en las pruebas de la memoria de referencia y de trabajo.

[0029] La monacolina K, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, fue reconocida como un metabolito importante con habilidad hipolipidémica en el RMR, la estatina está reconocida como un novedoso remedio para la EA gracias a la supresión de la formación de A β y de la respuesta inflamatoria inducida por A β (Chauhan et al. 2004; Li et al. 2006). Muchos estudios relacionados con la EA han usado estatinas para reducir la formación de A β en un modelo de ratón transgénico con EA (Yamada et al. 1999). La lovastatina nunca se ha usado para aliviar el deterioro de la memoria y capacidad de aprendizaje en los modelos de EA con ratones con infusión de A β . En este estudio, la lovastatina fue usada para sustituir la monacolina K de cara a investigar si el alivio del deterioro de memoria por administración de RMR se producía únicamente por efecto de la monacolina K. Los resultados de las pruebas de memoria dejaron claro que la lovastatina tiene un menor efecto de alivio del deterioro de la memoria que en el grupo RL, aunque ambos grupos incluían los mismos niveles de monacolina K y lovastatina. Por lo tanto, la monacolina K no es el único ingrediente funcional en la mejora del deterioro de la memoria inducido por A β .

[0030] Actualmente, el tratamiento y remedio de la EA se centra principalmente en la inhibición de la actividad de AChE para incrementar la concentración de la misma y mejorar la cognición cerebral y la función de la memoria (Nabeshima and Nitta 1994). Investigaciones relevantes con modelos animales de EA probaron que el neurotransmisor AChE del cerebro disminuía significativamente en las ratas con infusión A β . Algunas investigaciones probaron que las ratas con A β tenían mucho menos contenido de AChE que las ratas normales (Arendt et al. 1984; Darvesh et al. 2004). La disminución de la concentración de AChE y el incremento de la actividad de AChE causaron una grave pérdida de neuronas (Stephan and Phillips 2005). Además, el incremento de la actividad de AChE demostró estimular la agregación A β in vitro y formar compuestos con fibrillas A β (Stephan and Phillips 2005). Por tanto, la inhibición de la actividad AChE se considera como un mecanismo de protección de las neuronas para disminuir indirectamente el daño a la memoria causado por A β . La Fig. 6 es un diagrama de influencia que muestra el efecto de RMR en la actividad de la acetilcolinoesterasa en el hipocampo y córtex de las ratas con infusión A β . La infusión icv de A β produce un aumento de la actividad de AChE en el córtex en un 50,5% y en un 179,1% en el hipocampo comparado con el grupo vehículo. La administración de dosis simples o quíntuples de RMR inhibe significativamente la actividad incrementada por A β , pero la lovastatina es inefectiva para inhibir la actividad de AChE en el córtex e hipocampo. Los resultados sugieren que el ingrediente del RMR con efecto inhibitor de la actividad de las AChE producida por A β no es la monacolina K sino los otros metabolitos funcionales. No hay muchas investigaciones que presentaran a la lovastatina como un inhibidor de la actividad de la AChE, incluso algunas apuntaron que la lovastatina no tiene un efecto significativo en la actividad de la AChE. Estos resultados coinciden con la tendencia observada. Además de la monacolina K, los metabolitos eficaces del RMR pueden incluir otros inhibidores de AChE. Sin embargo, el metabolito GABA del RMR, es también un neurotransmisor y es útil para mejorar la cognición y la memoria de los pacientes de EA.

[0031] Se ha demostrado que la A β causa estrés oxidativo en el cerebro con EA. Por tanto, el reducir dicho estrés se consideró como objetivo prioritario de la investigación médica de desarrollo de medicamentos para EA. En la figura 7, la infusión de A β reduce los niveles del estado total de antioxidantes (TAS) del córtex e hipocampo en un 20,9% y un 20,4% respectivamente, comparados con el grupo vehicular. La administración de lovastatina puede incrementar los niveles de TAS en un 13,9% en el córtex comparado con los del grupo A β , pero es inefectiva en el hipocampo. Sin embargo, hay incrementos significativos del 24,6% y 46,2% en los niveles de TAS del córtex e hipocampo en el grupo RL. Sin embargo, los resultados del experimento mostraron que la dosis quíntuple de RMR era capaz de incrementar los niveles de TAS en el córtex e hipocampo de otros grupos en comparación con el A β .

[0032] Los efectos de la administración de RMR sobre los niveles de MDA en el córtex e hipocampo se muestran en la Fig. 8. Los niveles de MDA incrementan significativamente en un 95,3% y un 112% en el córtex e hipocampo respectivamente, por medio de la infusión con A β , pero el incremento de MDA revierte de forma remarcable con dosis-respuesta al aumentar la dosis de RMR.

[0033] Los grupos RL y RH también mostraron efectos neuroprotectores similares en la actividad del superóxido de dismutasa (SOD) del córtex e hipocampo tal y como se muestra en la Fig.9. Aunque la actividad del SOD de córtex e hipocampo se redujo en un 19,8% y un 25,2% respectivamente con la infusión de A β , los grupos RL y RH mostraron un incremento significativo de la actividad del SOD que había sido reducida por los A β en un 27,2% y un 52,7% en el córtex e hipocampo con una dosis simple, y en un 27,2% y un 60,9% con una dosis quíntuple de RMR.

[0034] En vista de lo anterior, las ratas del experimento sufrieron graves daños por estrés oxidativo en el córtex e hipocampo. El daño por estrés oxidativo puede ser aliviado incluyendo RMR en la dieta con dosis-respuesta para obtener un mejor efecto que el del grupo de la lovastatina. Los compuestos anti-oxidantes que se extraen de los productos fermentados-Monascus incluyen ácido dimérico, taninos, fenoles, ácidos grasos monoinsaturados y esteroides (Aniya et al. 1999; Wang et al. 2006).

[0035] Por tanto, la investigación indica que los compuestos antioxidantes pueden seleccionarse de entre cualquiera de los siguientes: ácido dimérico, taninos, fenoles, ácidos grasos monoinsaturados, esteroides, y superóxido de dismutasa (SOD).

[0036] El experimento produjo resultados de los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en córtex e hipocampo tal y como se muestran en la Fig. 10-A. La infusión de A β estimula significativamente los niveles de ROS en córtex e hipocampo en un 39,8% y un 28,7% ($p < 0.05$). Sin embargo, la administración diaria de RMR en los grupos RL y RH redujo en gran medida los niveles de ROS inducidos por A β en córtex e hipocampo en un 16,0% ($p < 0.05$) y 21,2% ($p < 0.05$) respectivamente en el grupo RL, y en un 35,4% ($p < 0.01$) y 21,3% ($p < 0.05$) respectivamente en el grupo RH. La disminución de los niveles de ROS en un 29,3% del córtex y de un 15,7% en el hipocampo ($p < 0.05$) también se dieron en el grupo de la lovastatina. La expresión del iNOS en el hipocampo se halló por mancha inmunohistoquímica como se ve en la Fig. 10-B. La infusión de A β resultó en un incremento significativo de la expresión de iNOS, pero dicha expresión se vio inhibida en los grupos RL y RH. Más importante es que la

expresión del iNOS del hipocampo en los grupos RL y RH es menor que en el grupo de la lovastatina. Los resultados muestran que el efecto antiinflamatorio en el grupo de la lovastatina es menor que en los grupos RL y RH con dosis simples y quintuples de RMR.

5 [0037] La reducción significativa en los niveles de ROS del córtex e hipocampo se puede ver como dosis-respuesta en los grupos a los que se administra RMR. Aunque la lovastatina se ha usado para reducir la respuesta inflamatoria producida por A β en modelos de célula, de acuerdo a la información que tenemos, el efecto neuroprotector de la lovastatina nunca ha sido usado para aliviar el deterioro de la memoria en modelos de EA con ratas bajo los efectos de A β . En este estudio, la administración de lovastatina también produjo una reducción significativa de los niveles de ROS y expresión de iNOS comparados con el grupo A β , pero el efecto fue menor que en los grupos RL y RH. Este no es el primer informe de la capacidad antiinflamatoria del RMR: se ha documentado que los metabolitos antiinflamatorios del RMR incluyen varias formas de monacolinas, seis azafilonas: monascina, ankaflavina, rubropunctatina, monascorburina, rubropunctamina y monascorburamina; dos furanoisofitálicos: xantomonasina A y xantomonasina B; y dos aminoácidos: (+)-ácido monascúmico y (-)-ácido monascúmico (Schubert et al. 1995). Queda claro que la monacolina K no es el único metabolito funcional que reprime la respuesta inflamatoria inducida por el A β . Otro experimento (Akihisa et al 2005) mostró que el RMR reducía la respuesta inflamatoria inducida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), la investigación probó también que los principales agentes antiinflamatorios son compuestos químicos de las azafilonas y furanoisofitálicos. Los resultados de dicho estudio y otras investigaciones relacionadas con respecto al RMR contra la inflamación sugieren que la respuesta del RMR reduciendo la inflamación inducida por A β resulta principalmente del mecanismo de coordinación colectivo de la monacolina K y los otros agentes antiinflamatorios.

[0038] De la misma manera, esta investigación produce un agente antiinflamatorio, que puede seleccionarse de los siguientes compuestos de ácido γ -aminobutírico (GABA), monascina, ankaflavina, rubropunctatina, monascorburina, rubropunctamina, monascorburamina, xantomonasina A, xantomonasina B, (+)-ácido monascúmico y (-)-ácido monascúmico.

[0039] Durante el experimento, se suministró A β 40 durante 28 días directamente al cerebro e hipocampo de las ratas. Los resultados de la Fig. 11 muestran que la acumulación de A β 40 en el hipocampo del grupo A β era mayor que en el del grupo vehículo. Se sabe, a partir de los resultados e investigaciones anteriores, que la infusión de A β 40 causa estrés oxidativo y respuesta inflamatoria en el cerebro, y paulatinamente una acumulación de A β 40. Una mayor acumulación de A β 40 causará más estrés oxidativo y respuesta inflamatoria, que agravará el

daño cerebral en un círculo vicioso. La lovastatina tiene la capacidad de reducir la respuesta inflamatoria inducida por A β 40, pero es débil contra el estrés oxidativo. A partir de los resultados, vemos que el contenido de A β 40 del grupo LS en el hipocampo era algo menor que el del grupo A β , y sin embargo había una gran acumulación de A β 40 en el cerebro. Los grupos RL y RH con dosis dietética de RMR tenían una acumulación de A β 40 en el hipocampo que el grupo A β . El motivo principal por el que el A β es capaz de reducir la acumulación del A β 40 en el hipocampo es debido a su capacidad de inhibición del estrés oxidativo y respuesta inflamatoria. Las ratas con infusión de A β 40 no se vieron afectadas por la acumulación debido a los agentes oxidativos inflamatorios, por lo que el A β 40 fue incapaz de causar daños al cerebro como para mejorar la memoria y capacidad de aprendizaje.

[0040] Las monacolinas, agentes antiinflamatorios y compuestos antioxidantes incluidos en la formulación y método para la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer del presente documento se extraen de la levadura roja de arroz (RMR) para mejorar los síntomas existentes o para ralentizar el proceso de la enfermedad de Alzheimer. En el primer método de la invención, la dosis efectiva de monacolinas en 1g de levadura de arroz rojo es mayor a 100 μ g, la dosis mínima de compuestos antioxidantes en 1g de levadura de arroz rojo es mayor a 40 μ g, y la dosis mínima efectiva de agentes antiinflamatorios en 1g de levadura de arroz rojo es mayor a 10 μ g, donde las monacolinas, agentes antiinflamatorios y compuestos antioxidantes tienen una relación en peso de 40:2:1 para poder obtener la eficacia óptima. Las monacolinas, agentes antiinflamatorios y compuestos antioxidantes tienen su relación de peso óptima entre 10:4:1 y 90:2:1, y el compuesto de la invención puede ser administrado en distintas formas, como pastillas, cápsulas, polvo, líquido, etc.

[0041] El agente antiinflamatorio de la levadura roja de arroz (RMR) es el ácido γ -aminobutírico (GABA). La levadura roja de arroz se considera como alimento natural y se fermenta y extrae por medio de métodos específicos sin causar efectos secundarios al cuerpo humano. Por tanto, las aplicaciones del RMR para la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer producen resultados efectivos sin causar efectos secundarios en pacientes, como en el caso de los medicamentos convencionales.

[0042] Así, en base a los resultados experimentales ya mencionados, se puede concluir que el compuesto para la prevención y tratamiento del Alzheimer consiste de monacolinas y agentes antiinflamatorios y antioxidantes, siendo extraídos en su totalidad de la levadura roja de arroz, que es obtenida por medio de un proceso de fermentación controlado usando Orza sativa L., Japomica como materia prima para la levadura roja de arroz. Además, de acuerdo a las descripciones anteriores, se puede especificar que el agente antiinflamatorio es del grupo del

ácido γ -aminobutírico (GABA), una monascina, una ankaflavina, una rubropunctatina y una monascorburina. El Agente antioxidante se selecciona del grupo que contiene un ácido dimerómico, un ácido graso monoinsaturado y esteroides.

La característica técnica más importante de cara a la composición es que las monacolínes, los agentes antiinflamatorios y antioxidantes tengan una relación de peso de 40:2:1.

[0043] En referencia a las Figs. 12-1 ~ 12-3, la invención provee de un método para usar en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprende los siguientes 20 pasos:

10 El primer paso es lavar el arroz y llevar a cabo una esterilización bajo alta presión y alta temperatura (paso 100); se usa arroz largo (*Oryza sativa L.*, Japonica) comprado en un supermercado corriente de Taiwan para ser usado en la producción de RMR bajo cultivo en estado sólido en el entorno de alta presión y temperatura ya mencionadas, concretamente 121

15 °C a 1Kg/cm². El segundo paso es cultivar un *Monascus purpureus* en un medio fresco a una primera temperatura específica, humedecerlo y agitarlo durante un primer periodo de tiempo específico: el *Monascus purpureus* en medio fresco significa que al menos 5g del arroz se humedecen con 100ml de agua destilada, el primer tiempo específico es 48 horas más tarde, y la primera temperatura específica es 30°C, el ambiente agitado específico se mantiene a una

20 velocidad rotacional entre 100 y 150 revoluciones por minuto (rpm); en otras palabras, el *Monascus purpureus* se cultiva en medio y se mantiene a una temperatura de 30°C, velocidad rotacional de 125 rpm y después de 48 horas el cultivo está listo para ser recogido. Se recogen entonces 500g de cultivo en medio sólido, el *Monascus* se sumerge en agua entre 6 y 8 horas, se filtra con tejido de algodón y se coloca sobre una pieza de gasa en una bandeja de

25 esterilización (121°C, 20.25 min). A continuación se lleva a cabo otra esterilización (121°C, 20 min) después de volver a hidratar con 100mL de agua. Después de enfriarse, se efectúa otro cultivo con *Monascus* colocándolo en medio sólido (5%). Por tanto, el paso es para agitar suficientemente el medio a la primera temperatura ambiental específica, y proveer un porcentaje específico de agua en el segundo intervalo de tiempo específico (paso 120). Este

30 segundo intervalo es de 72 horas, el porcentaje específico de agua significa que se suministra un 20% de agua destilada estéril, en otras palabras: el *Monascus* se cultiva en un contenedor con temperatura regulable a 30°C, agitando la mezcla cada 24 horas durante 72 horas y suplementando con un 20% de agua destilada estéril. El siguiente paso consiste en agitar adecuadamente el medio durante un tercer período de tiempo específico en el primer entorno

35 específico de temperatura a intervalos para que haya maduración (paso 130), en el que la maduración es la etapa de formación de metabolitos y el tercer plazo de tiempo específico es de 96 horas. Los intervalos fijos son iguales a 10 horas. Es decir, el medio del *Monascus* se

agita adecuadamente cada 10 horas durante un tiempo total de 96 horas. Posteriormente, después de la fermentación, se obtiene un producto fermentado de *Monascus* y se seca el producto durante un cuarto periodo específico de tiempo a una segunda temperatura específica (paso 140), donde el cuarto periodo de tiempo específico significa dentro de 24 horas y la

5 segunda temperatura específica se mantiene en el intervalo de temperatura de 55 a 60 °C. Este paso es para recoger *Monascus* y llevar a cabo el procedimiento de secado del producto fermentado de *Monascus* durante 24 horas a 60 °C. El siguiente paso es moler el producto fermentado de *Monascus* seco en polvo y analizar si el producto fermentado de *Monascus* se ajusta a la proporción requerida para el compuesto (paso 150), en el que la proporción de

10 composición requerida tiene una composición de monacolininas, agentes anti-inflamatorios y compuestos antioxidantes en una relación de peso de 10: 4: 1 a 90: 2: 1. Si el polvo fermentado de *Monascus* no se ajusta a la proporción requerida, el proceso se considera un fracaso. Cuando el polvo fermentado de *Monascus* se ajusta a la proporción de composición requerida en la invención para la prevención y tratamiento de la EA, hay que seguir los pasos A y B como

15 se muestra en las Figs. 12-2 y 12-3. Después de la etapa A, el paso final es disolver el polvo fermentado de *Monascus* en agua, en una proporción específica para hacer una bebida de *Monascus* que pueda prevenir y tratar la EA (paso 160) y completar el proceso. La proporción específica es entre 1,0% y 4,0%.

[0044] Siguiendo el paso B, hay que colocar el polvo fermentado de *Monascus* en una cápsula

20 o hacer un comprimido con el polvo fermentado de *Monascus*.

[0045] El experimento para este descubrimiento se lleva a cabo con medio convencional para la producción de *Monascus* en cultivo de medio sólido, el tamaño de la cápsula de koji es de 20x30x5 cm, y se coloca una gasa en la parte inferior del medio para que agitar y mantener la

25 humedad sean tareas sencillas, hay otra gasa en la parte superior para separar de la contaminación externa y mantener la humedad del *Monascus* durante la fermentación. El cultivo se lleva a cabo en un sitio disponible. Consecuentemente, el compuesto aquí descrito se puede suministrar con varias formas de pastillas, cápsulas, polvo, bebidas, etc.

30

REIVINDICACIONES

1. Compuesto para el uso en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que incluye:

5

monacolin, extraídas de la levadura roja de arroz, en la cual la levadura de arroz rojo se fabrica por medio de un proceso controlado de fermentación usando *Orvza sativa L.*, Japonica como materia prima del arroz rojo, agentes antiinflamatorios, extraídos del arroz rojo, y seleccionados del grupo consistente en el ácido γ -aminobutírico (GABA), monascina, ankaflavina, rubropunctatina y monascorburina; y agentes antioxidantes, extraídos de la levadura de arroz rojo, y seleccionados del grupo compuesto por un ácido dimerúmico, un ácido graso monoinsaturado y un estero; en el que las monacolin, los agentes antiinflamatorios y antioxidantes extraídos de 1g de la levadura del arroz rojo tienen una relación en peso igual a 40:2:1, en la que el proceso controlado de fermentación comprende los siguientes pasos:

15

(1) lavado del arroz usado como materia prima y llevar a cabo la primera esterilización a 1kg/cm² y a 121°C, y entonces se usa el arroz *Orvza sativa L.*, Japonica como medio de cultivo.

(2) Humedecer el medio con agua destilada.

20

(3) Hacer un primer cultivo de *Monascus* usando *Monascus purpureus* en el medio de cultivo bajo una primera temperatura específica de 30°C y un medio específico para agitarlo de 100~150 rpm/min durante un primer intervalo de tiempo específico para obtener un cultivo en estado sólido; el primer intervalo de tiempo es de 48 horas.

(4) Recoger el cultivo en estado sólido, y sumergirlo en agua de 6 a 8 horas.

25

(5) Filtrar el cultivo en estado sólido con una gasa de algodón para eliminar el agua, y colocarlo en la gasa de algodón sobre un plato para llevar a cabo una segunda esterilización a 121°C entre 20~25 min.

(6) Después de enfriarse, se produce un segundo cultivo de *Monascus* colocando una suspensión de *Monascus purpureus* (v/v, 5%) en el cultivo en estado sólido.

30

(7) Agitar de forma suficiente el cultivo en estado sólido obtenido del medio del paso (6) a 121°C, y suministrar un porcentaje específico del 20% de agua destilada estéril durante un segundo periodo de tiempo específico de 72 horas.

(8) Agitar correctamente el cultivo con el 20% de agua destilada estéril obtenido en el paso (7) cada 10 horas hasta que hayan transcurrido 96 horas, bajo una temperatura de 121°C, para que se forme la levadura del arroz rojo.

35

(9) Recoger la levadura del arroz rojo;

(10) secar el arroz rojo a 55-60 °C durante 24 horas;

(11) Moler la levadura de arroz rojo seca en polvo de levadura de arroz.

(12) Determinar si las monacolininas, el agente antiinflamatorio y el antioxidante extraídos de 1g del polvo del arroz rojo tienen un porcentaje en peso del 40:2:1. Si es así, proceder al paso (13), y

5 (13) Tomar el polvo de levadura de arroz rojo como el compuesto a ser usado en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

2. El compuesto para usarse en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, de acuerdo con la reivindicación 1, requiere de una dosis de 2g/día para un adulto.

10

3. La composición para ser usada en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, de acuerdo con la reivindicación 1 puede reducir la actividad de la Acetilcolinoesterasa en el hipocampo y córtex al menos en un 40% y 17,86%.

15 4. La composición para ser usada en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, de acuerdo con la reivindicación 1 puede reducir el nivel de Malondialdehído (MDA) en el hipocampo y córtex al menos en un 30,77% y 41,67% .

20 5. La composición para ser usada en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, de acuerdo con la reivindicación 1 puede reducir la concentración de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en el hipocampo y córtex al menos en un 21,2% y 16,0%.

25 6. La composición para ser usada en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, de acuerdo con la reivindicación 1 puede reducir la acumulación de Beta-Amiloide 40 (A β 40) y de sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) en el hipocampo al menos en un 74,846% y 90,9%, respectivamente.

30 7. La composición para usar en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con la reivindicación 1, puede incrementar la actividad del estado total de antioxidantes (TAS) en el hipocampo y córtex al menos en un 46,2% , 24,6%.

8. La composición para usar en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con la reivindicación 1, puede incrementar la actividad del superóxido de dismutasa (SOD) en el hipocampo y córtex al menos en un 52,7% y 27,2%.

35

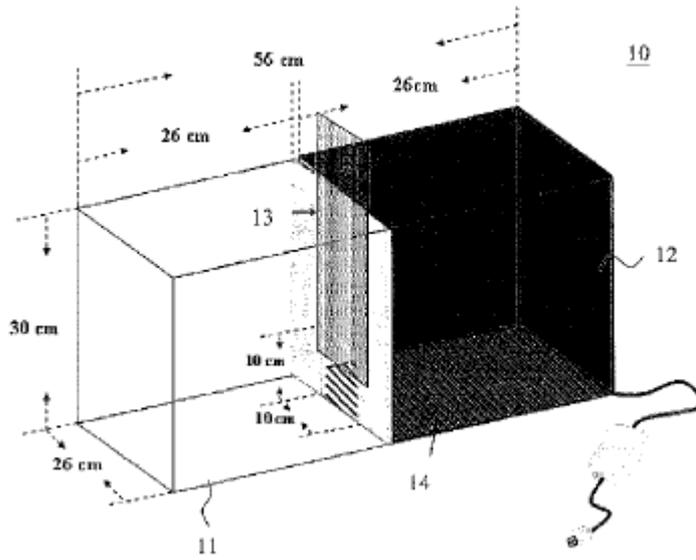


Fig 1

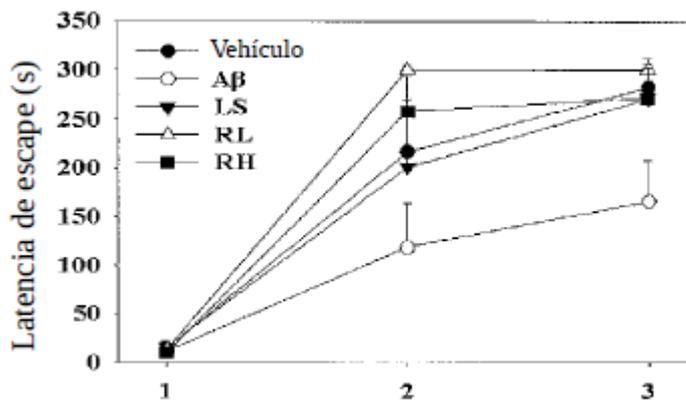


Fig 2

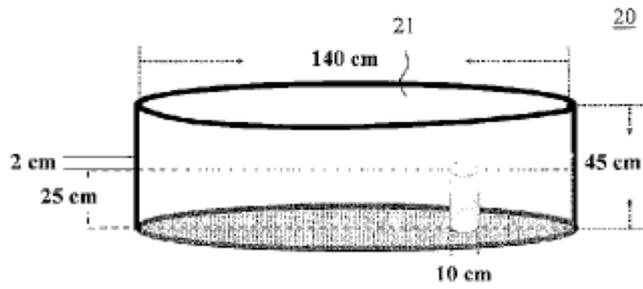


Fig 3

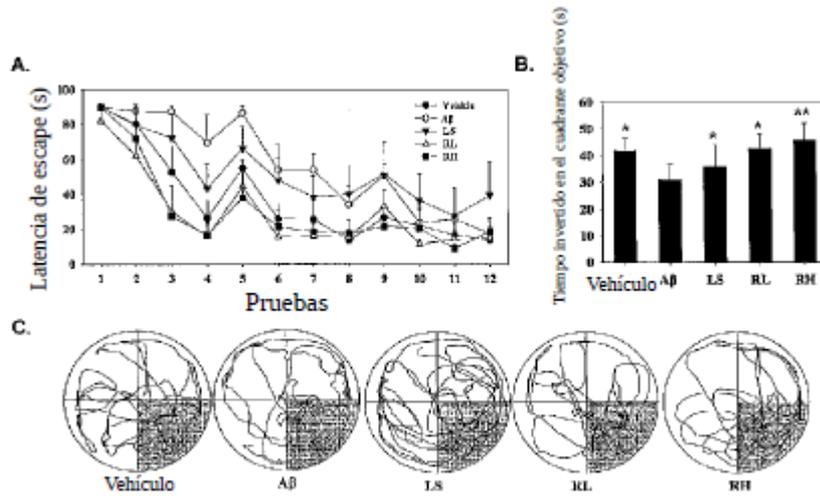


Fig 4

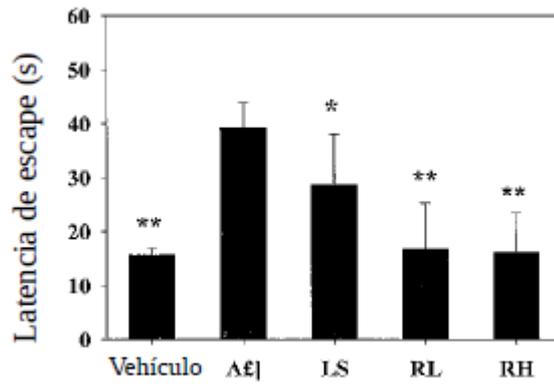


Fig 5

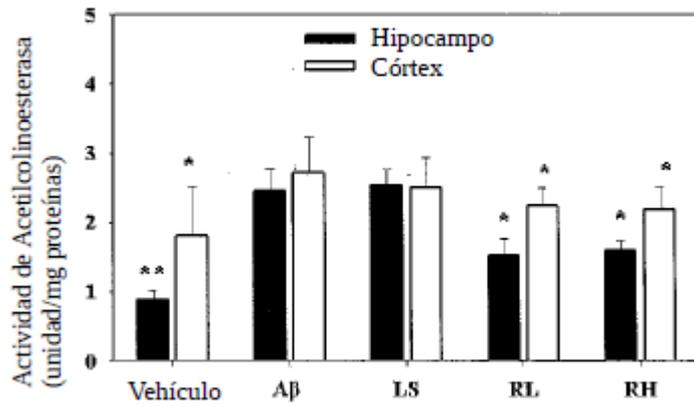


Fig 6

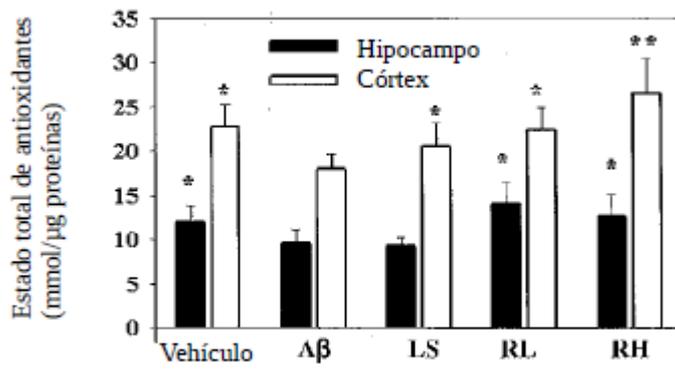


Fig 7

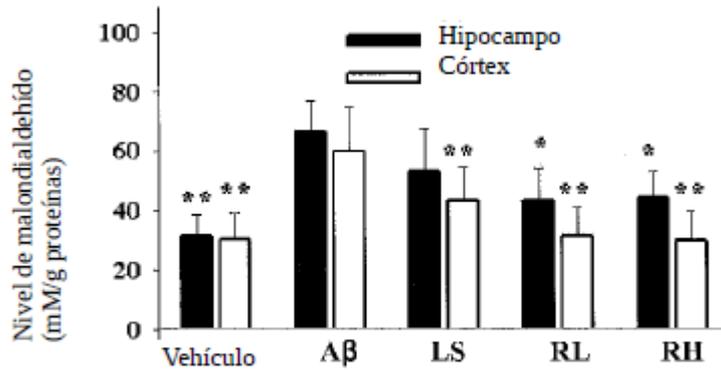


Fig 8

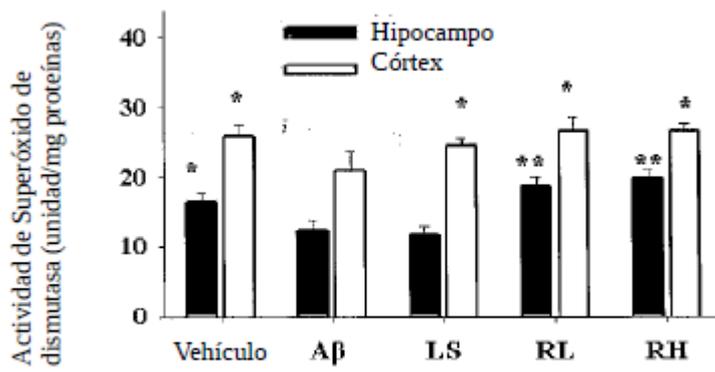


Fig 9

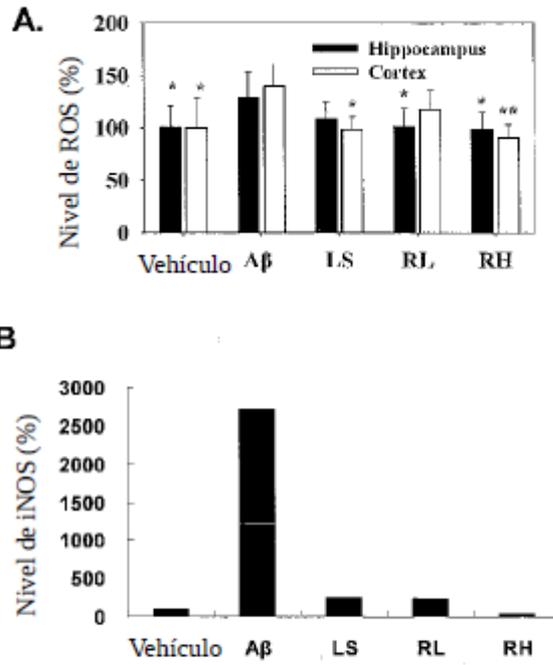


Fig 10

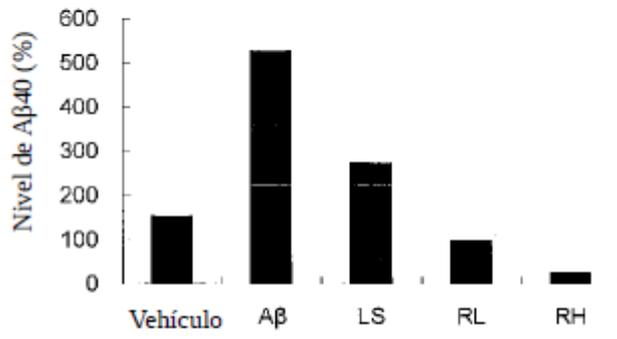


Fig 11

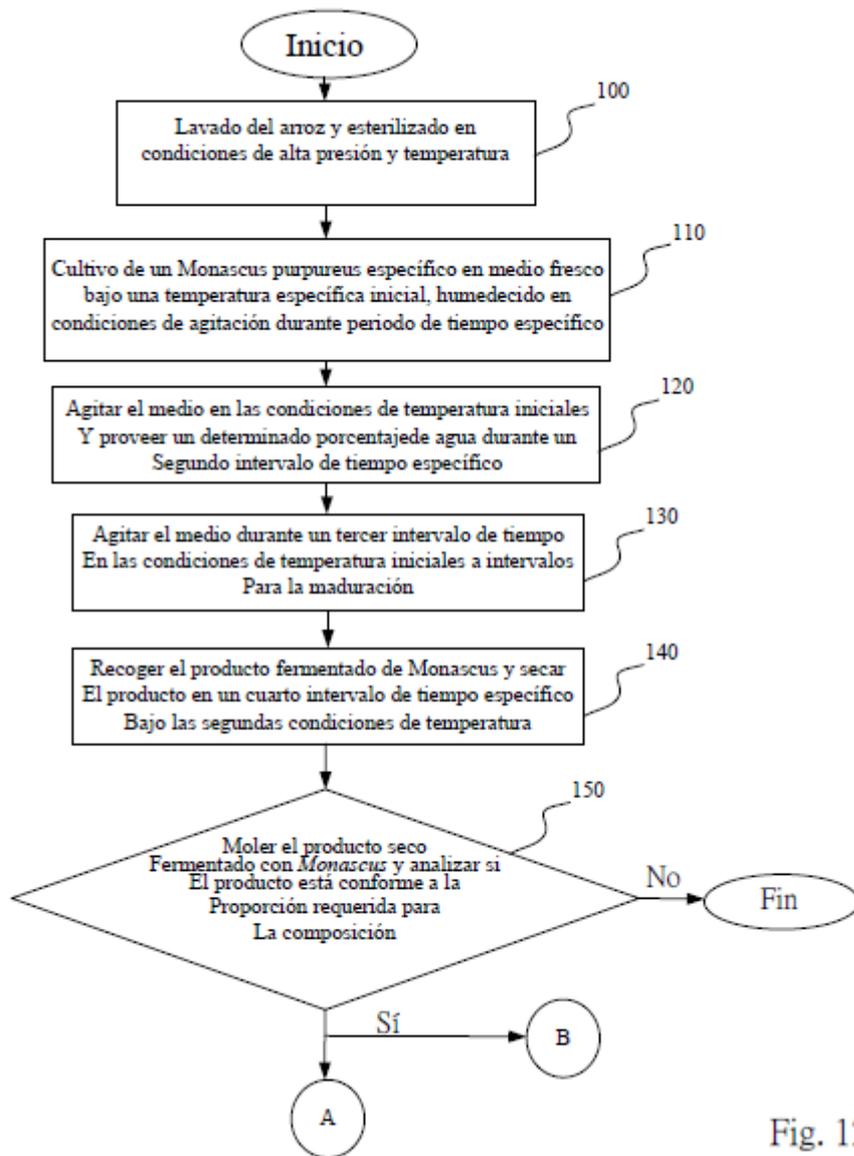


Fig. 12-1

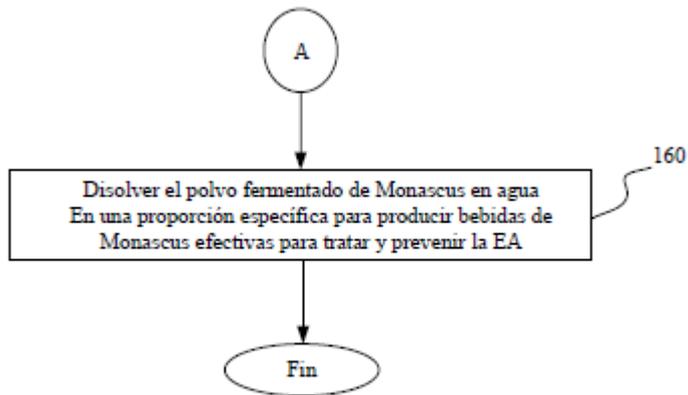


Fig. 12-2

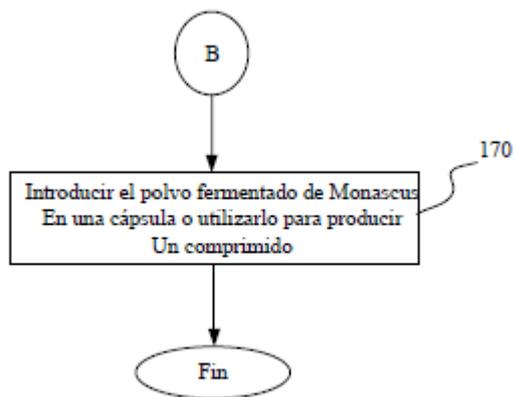


Fig. 12-3