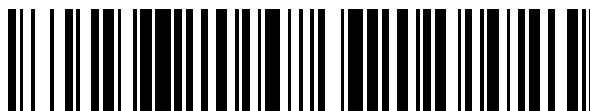


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 652**

51 Int. Cl.:

A61K 36/8945 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2011** **E 11861135 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2685998**

54 Título: **Composición que comprende un extracto de hierbas para la prevención o el tratamiento de trastornos neurodegenerativos**

30 Prioridad:

16.03.2011 KR 20110023545

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

21.09.2016

73 Titular/es:

**DONG-A ST CO., LTD. (100.0%)
(Yongdu-dong) 64, Cheonho-daero,
Dongdaemun-gu
Seoul 130-823, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SOON-HOE;
SON, MI-WON;
CHOI, SANG-ZIN;
KIM, HYE-JU;
RYU, JA-YOUNG y
KIM, SUN-YEOU**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 583 652 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 que comprende un extracto de hierbas para la prevención o el tratamiento de trastornos neurodegenerativos

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición que comprende un extracto de hierbas para la prevención o el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, en la que este comprende *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* mezcladas en una relación en peso de 3,5:1 (p/p).

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Programa Global de Tecnología Punta de la Oficina de Planificación Estratégica (OSP) sobre I + D fundada por el Ministerio de Economía del Conocimiento, República de Corea. (n.º 10039303)

Antecedentes

Los trastornos neurodegenerativos significan una pérdida estructural y funcional de modo gradual de una célula nerviosa (neurona). Normalmente afectan a una zona particular del sistema nervioso, acompañando a los síntomas tales como demencia, enfermedad extrapiramidal, trastorno cerebeloso, disestesia o discinesia. Pueden mostrar síntomas complejos cuando afectan a varias zonas al mismo tiempo. Se obtiene un diagnóstico mediante un signo clínico del paciente. Sin embargo, el diagnóstico en este caso es difícil de realizar ya que muestra múltiples síntomas y las diversas enfermedades tienen signos clínicos comunes. (Soc. Sci. Med. Vol. 40, n.º 6, págs. 847-855, 1995).

Los signos del comienzo de los trastornos neurodegenerativos aparecen gradualmente y la mayoría se producen con el envejecimiento. Una vez que se inician, los trastornos neurodegenerativos progresan durante varios años o décadas hasta la muerte. Se sabe que los efectos genéticos de acuerdo con la historia familiar son considerables. Según los síntomas clínicos, los trastornos neurodegenerativos se clasifican en demencias paralíticas (enfermedad de Alzheimer, etc.), trastornos neurológicos (enfermedad de Pick, etc.), anomalías de la postura y el ejercicio (enfermedad de Parkinson, etc.), ataxia progresiva, debilidad y atrofia muscular, y trastornos del movimiento y las sensaciones. (International Journal of Engineering and Technology, Vol. 2, n.º 4, agosto 2010 "Classification of Neurodegenerative Disorders Based on Major Risk Factors Employing Machine Learning Techniques").

En los años 80, se planteó que los factores neurotróficos tenían potencial para tratar trastornos neurodegenerativos tales como un experimento de enfermedad de Alzheimer (Nature, 1987, Sep. 3-9; 329(6134):65-8, "Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor"). La pérdida de neuronas del prosencéfalo basal por el envejecimiento conocida como enfermedad de Alzheimer se recupera mediante la administración del factor de crecimiento nervioso (NGF) al ventrículo lateral del cerebro. Puesto que se ha comunicado una mejora de la memoria de los animales ensayados, se realizan estudios para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos usando el factor neurotrófico. Se ha encontrado un buen resultado ya que la función de neuronas motoras dañadas se recupera mediante el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3), la neurotrofina-4 (NT-4), y el factor neurotrófico ciliar (CNTF), como familia de factores neurotróficos, en el estudio tras dañar la función de las neuronas motoras mediante la sección de los nervios faciales y los nervios ciáticos como estudio de seguimiento (Nature, 1992, Dic 24-31; 360(6406):757-9, "Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motor neurons in newborn rats after nerve section"). En el experimento, que utilizó ratones de recombinación genética (Wobbler) que sufrieron la pérdida de sus neuronas y función motoras gradualmente, la función se mejoró mediante la administración de BDNF y CNTF para aumentar el número de neuronas motoras. (Science, 1994, Agosto 19; 265(5175):1107-10, "Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF"). Además de dichos experimentos, los factores neurotróficos aumentan las neuronas y su función en el modelo patológico de neuronas motoras y varios sentidos, por lo que mostraron una mejora del trastorno relacionado con la memoria, la percepción, y el comportamiento en animales de laboratorio.

Basándose en los resultados de los experimentos preclínicos, hubo ensayos para aplicar el factor neurotrófico para el tratamiento de la enfermedad de Lou Gehrig en los 90. La enfermedad de Lou Gehrig es una enfermedad nerviosa degenerativa que solo destruye neuronas motoras selectivamente y provoca la muerte de la persona debido a la disfunción de los órganos respiratorios con parálisis de todo el cuerpo. Se administró BDNF por vía hipodérmica o subaracnoidea, si bien presentó dolor en la región de inyección y efectos secundarios en el sistema digestivo. Así, pues solo quedó la opción de administrar una cantidad de BDNF menor que la del experimento preclínico. Como resultado, la regeneración y la mejora de las neuronas motoras y su función tuvieron un efecto mínimo. (Exp Neurol, 1993 Nov; 124(1):64-72, "Review. Experimental rationale for the therapeutic use of neurotrophins in amyotrophic lateral sclerosis") Análogamente, se presentaron síntomas tales como fiebre, dolor en la región de inyección o pérdida del apetito, que eran reacciones adversas menos graves que en el caso de la administración de BDNF, cuando se inyectó CNTF al paciente que padecía la enfermedad de Lou Gehrig, por lo que el CNTF se administró en una cantidad limitada. Como resultado, la regeneración y la mejora de las neuronas motoras y su función fueron insignificantes. (Neurobiol Aging, 1994, Marzo-Abril; 15(2):249-51, "Review Neurotrophic growth factors and

neurodegenerative diseases: therapeutic potential of the neurotrophins and ciliary neurotrophic factor"). El método que tenía un factor neurotrófico tal como el BDNF, el CNTF, etc. en forma de proteína recombinante que alcanza el sistema nervioso periférico y central mediante inyección *in vivo*, tenía la cantidad limitada de proteína para inyección. En el caso del experimento que intentó tratar a un paciente con enfermedad de Alzheimer usando el NGF, no pudo

mostrar un resultado significativo ya que hubo efectos secundarios, el límite de la cantidad de inyección, la administración del fármaco y una farmacodinámica indeterminada.

A pesar del resultado decepcionante del experimento clínico, ha habido muchas evidencias experimentales de que es posible el tratamiento de trastornos neurodegenerativos usando factores neurotróficos. Normalmente, en el caso de la enfermedad de Huntington, cuyos síntomas son movimientos anómalos, cambios de personalidad, disminución de la capacidad cognitiva y muerte prematura debida a un aumento de la poli Q en la proteína huntingtina, muchos estudios señalaron al BDNF como diana principal de la proteína huntingtina anómala. Esta teoría estaba respaldada por una disminución de la cantidad de BDNF en el estriato de los animales del laboratorio patológico y del paciente que padecía la enfermedad de Huntington. (*Science*, 2001 Jul 20; 293(5529):493-8. Pub electrónica 2001 Jun 4 "Loss of Huntington-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease").

A propósito, cuando se eligió el método para administrar el factor neurotrófico por vía hipodérmica o subaracnoidea *in vivo* con la forma de una proteína recombinante al igual que el método existente para tratar trastornos neurodegenerativos, se repitió la disminución de la cantidad de administración y una disminución de su efecto debido a este efecto secundario. Por tanto, en los 2000 se realizaron los estudios de un promotor del factor neurotrófico, que es un modo indirecto de aumentar la cantidad de factor neurotrófico que se biosintetiza por sí mismo *in vivo*. (*Hum Gene Ther.* 1999 Dic 10; 10(18):2987-97, "Brain-derived neurotrophic factor-mediated protection of striatal neurons in an excitotoxic rat model of Huntington's disease, as demonstrated by adenoviral gene transfer").

La *Dioscorea Rhizoma*, una planta que pertenece al género de las *Dioscoreaceae*, es el término para el rizoma fresco de *Dioscorea batatas* Decaisne o *Dioscorea japonica* Thunberg, sin peridermis, o para el obtenido después del tratamiento con vapor y secado del rizoma fresco de la hierba medicinal. Está ampliamente distribuida en Corea, China y Japón, y se ha usado en medicina. Tiene efectos medicinales sobre la nutrición tónica, trastornos digestivos, diabetes, tos, enfermedades pulmonares, fortalecimiento de la función renal, etc. y su toxicidad y efectos secundarios no se han comunicado con frecuencia. Asimismo, la *Dioscorea nipponica* es un rizoma de la *Dioscorea nipponica* Makino, una planta trepadora perenne de las *Dioscoreaceae*. Está ampliamente distribuida en Corea, China y Japón, y se ha usado en medicina. Tiene efectos en cuanto a una mejora de la circulación sanguínea, relajación muscular, eliminación de indigestiones, efecto diurético, eliminación de esputos y prevención del paroxismo malárico, y su toxicidad y efectos secundarios no se han comunicado con frecuencia.

La patente coreana n.º 854621 proporciona una composición para la prevención y el tratamiento de la neuropatía periférica, que comprende un extracto de una planta seleccionada entre *Dioscorea nipponica*, *Dioscorea quinqueoloba*, *Dioscorea batatas*, *Dioscorea japonica* y *Dioscorea tokora*, divulgando que la composición induce el crecimiento de neuritas y aumenta la secreción del factor de crecimiento nervioso endógeno, siendo eficaz, por tanto, para la prevención o el tratamiento de la neuropatía periférica.

Los presentes inventores confirmaron que la función del extracto de una planta seleccionada entre *Dioscorea nipponica*, *Dioscorea quinqueoloba*, *Dioscorea batatas*, *Dioscorea japonica* y *Dioscorea tokora*, era inducir el crecimiento significativo de neuritas y aumentar la secreción del NGF endógeno tal y como se describe en la patente de Corea n.º 854621. Basándose en esto, la presente invención se ha completado tras determinar que la *Dioscorea Rhizoma* y la *Dioscorea nipponica* en una proporción selectivamente particular muestran una sinergia significativa, si bien cada una de dichas hierbas o los extractos mixtos de dichas hierbas inducen de modo sorprendente casi el mismo crecimiento de neuritas así como un aumento de la secreción del factor de crecimiento nervioso endógeno, mientras estudiaban un extracto de hierbas que tiene efectos sobre la proliferación de células neuronales, la promoción de la formación de neuritas y la potenciación de las capacidades cognitivas mediante el aumento del contenido del factor de crecimiento nervioso en los animales de laboratorio *in vivo*.

Divulgación de la invención

Problema técnico

Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición herbaria opcional que muestra sinergia para potenciar las capacidades cognitivas mediante el aumento de la proliferación de células neuronales y la promoción de la formación de neuritas tras la estimulación de la producción y secreción de factores de crecimiento nervioso, entre las hierbas divulgadas en la patente de Corea n.º 854621, a fin de potenciar la regeneración y prevenir la apoptosis de las neuronas.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica y un alimento funcional saludable para la prevención o el tratamiento de trastornos degenerativos, que comprende dicha composición herbaria como principio activo.

Solución al problema

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica y un alimento funcional saludable para la prevención o el tratamiento de trastornos neurodegenerativos que comprende un extracto mixto de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 (p/p).

La presente invención se describirá con detalle en lo sucesivo en el presente documento.

La presente invención se refiere a un producto farmacéutico para la prevención o el tratamiento de trastornos neurodegenerativos que comprende un extracto mixto de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 (p/p).

El extracto mixto de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 (p/p) comparado con el peso total es un extracto bruto, que es un extracto extraído preferentemente con un 50 % de etanol.

Los extractos de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* se pueden obtener tal y como se indica a continuación. En primer lugar, las hierbas se prepararon cortando hierbas secas tras limpiar y secar la *Dioscorea Rhizoma* y la *Dioscorea nipponica*, respectivamente. Después los extractos herbarios mixtos de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 (p/p) se pueden obtener mediante concentración a presión reducida después de un tiempo de extracción en frío durante 48 horas a temperatura ambiente con un 50 % de etanol 5 veces más que el peso total de dichas hierbas cortadas.

La presente invención proporciona el uso de extractos herbarios mixtos con *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 (p/p) para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

Los ejemplos de trastornos neurodegenerativos según la presente invención incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, la enfermedad de Huntington, la esclerosis múltiple, el síndrome de Guillain-Barre, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Lou Gehrig, la demencia parálitica causada por la muerte gradual de neuronas y enfermedades causadas por incontinencia progresiva.

De acuerdo con la presente invención, una preparación farmacéutica para la prevención o el tratamiento de trastornos neurodegenerativos se puede formular añadiendo un vehículo, excipiente o agente diluyente farmacéuticamente aceptable a los extractos herbarios mixtos de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 (p/p).

Los extractos herbarios necesarios para formular una preparación farmacéutica de la presente invención incluyen de un 0,01 a un 80 % de dichos extractos, preferentemente de un 1 a un 50 % en peso comparado con el peso total.

El vehículo, excipiente o agente diluyente que se puede incluir en la composición de la presente invención puede ser lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábiga, alginato, gelatina, fosfato cálcico, silicato cálcico, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio o aceite mineral.

Asimismo, la composición de la presente invención se puede formular y usar en forma de un agente oral tal como un polvo, gránulos, comprimidos, cápsulas, una suspensión, emulsión, jarabe o aerosol, preparación externa, supositorio o solución para inyección estéril de acuerdo con el método habitual.

Específicamente, se podría preparar una preparación farmacéutica mediante el uso de excipientes o agentes diluyentes tales como un filtro, extensor, agente de aglutinamiento, agente humectante, agente disgregante o tensioactivo que son usados habitualmente. La preparación farmacéutica sólida para administración oral incluye comprimidos, pastillas, polvos, gránulos y cápsulas. La preparación farmacéutica sólida se puede formular añadiendo al menos uno o más agentes diluyentes tales como almidón, carbonato cálcico, sacarosa, lactosa o gelatina a dicho complejo herbario. Además, lubricantes tales como estearato de magnesio o talco aparte de dichos agentes diluyentes. La preparación farmacéutica líquida incluye una suspensión, líquido medicinal para uso interno, emulsión o jarabe. Podría incluir diversos agentes diluyentes tales como agentes de humectación, agentes edulcorantes, un ambientador o un agente de conservación aparte de diluyentes simples tales como agua y parafina líquida que se usan normalmente. Una preparación farmacéutica para administración parenteral incluye una solución estéril, un disolvente no acuoso, una suspensión, una emulsión, un agente liofilizado o un supositorio. Se podrían usar propilenglicol, polietilenglicol, un aceite vegetal, tal como aceite de oliva, o un éster inyectable, tal como un etiolato, para una suspensión o un disolvente no acuoso. Para supositorios, se podrían usar Witepsol, polietilenglicol, Tween 61, manteca de cacao, laurina o glicerol-gelatina.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, en el que se administra a mamíferos, incluyendo humanos, una cantidad farmacéuticamente

activa de una composición farmacéutica que comprende los extractos herbarios mixtos de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 como principio activo.

La dosificación de la composición farmacéutica que comprende los extractos herbarios mixtos de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 depende de la edad, sexo y peso del paciente; no obstante se puede administrar en una cantidad de 0,01 a 10 g/kg, preferentemente de 1 a 5 g/kg, cantidad que se administra una vez al día o dividida en varias veces al día. Asimismo, la dosificación se puede aumentar o disminuir de acuerdo con la vía de inyección, grado de la enfermedad, sexo, peso, edad, estado de salud, dieta, tiempo de inyección, método de inyección o velocidad de excreción. Por tanto, no se pretende de ningún modo que la dosificación limite el alcance de la presente invención.

La composición farmacéutica que comprende los extractos herbarios mixtos de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 (p/p) de la presente invención se puede administrar a mamíferos tales como ratas, ratones, vacas o humanos por las diversas vías. Se puede esperar todos los tipos de administración, por ejemplo oral, rectal o intravenosa, intramuscular, hipodérmica, endometrial o inyecciones intracerebroventriculares.

Los extractos herbarios mixtos de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 de la presente invención casi nunca han mostrado toxicidad o efectos secundarios y, por tanto, es seguro tomar una dosis durante largo tiempo para los fines de la invención.

Los inventores han estudiado los efectos sobre la proliferación de células neuronales, la promoción de la formación de neuritas y la potenciación de las capacidades cognitivas mediante el aumento de la cantidad de factores de crecimiento nervioso en los animales de laboratorio, usando los extractos herbarios mixtos con *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1. Han descubierto entonces la sinergia significativa en comparación con un extracto único de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* y otra relación entre ellos mediante experimentos en un modelo de animales de laboratorio o en células.

Asimismo, la presente invención proporciona un alimento funcional saludable para la prevención o la mejora de trastornos neurodegenerativos.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "alimento funcional saludable" se pretende que incluya aquellos definidos en la "Ley de 2002 de alimentos funcionales saludables", tales como los alimentos saludables encontrados en la lista que estipula los materiales o ingredientes de alimentos funcionales saludables verificados en cuanto a su funcionalidad y seguridad para humanos de acuerdo con la Notificación KFDA n.º 2004-12 de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Corea.

Más en particular, la presente invención proporciona un alimento funcional saludable para la prevención o la mejora de trastornos neurodegenerativos, que comprende los extractos herbarios mixtos con *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 y un aditivo alimentario sitológicamente aceptable.

La composición que comprende los extractos herbarios mixtos con *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 se puede aplicar a fármacos, alimentos y bebidas para aliviar los síntomas de los trastornos neurodegenerativos. Por ejemplo, los alimentos a los que se puede añadir el extracto herbario de la presente invención incluyen bebidas, chicles, té, complejos vitamínicos y complementos alimentarios. Para su uso en fármacos, el extracto herbario puede estar en forma de pastillas, polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas o líquidos.

Cuando se aplica a alimentos sólidos, el extracto herbario de la presente invención se puede usar en una cantidad de alimento del 0,1 al 15 % en peso basado en el peso total del alimento y, preferentemente, en una cantidad del 0,2 al 10 % en peso. En forma de líquido saludable, el extracto herbario de la presente invención puede variar en una cantidad de 0,1 a 30 g por 100 ml de líquido y, preferentemente, de 0,2 a 5 g.

A excepción de la relación específica dada para los ingredientes herbarios indispensables, no se impone ninguna limitación particular a la composición de líquido saludable. Al igual que las bebidas normales, la composición de líquido saludable puede comprender adicionalmente diversos agentes aromatizantes, carbohidratos naturales, u otros aditivos.

Los ejemplos preferentes de carbohidratos naturales incluyen monosacáridos tales como glucosa, fructosa, etc.; disacáridos tales como maltosa, sacarosa, etc.; polisacáridos tales como dextrina, ciclodextrina, etc.; y alcoholes de azúcar tales como xilitol, sorbitol, eritritol, etc. Los agentes aromatizantes útiles en la presente invención pueden ser naturales (taumatina, extracto de estevia (por ejemplo, rebaudiósido A, glicirrina), o sintéticos (sacarina, aspartamo). Los carbohidratos naturales se pueden usar en una cantidad de aproximadamente 1 a 20 g por 100 ml de la composición de líquido saludable y, preferentemente, en una cantidad de aproximadamente 5 a 12 g.

Además, la composición de la presente invención puede contener diversos nutrientes, vitaminas, minerales (electrolitos), agentes aromatizantes naturales y/o sintéticos, colorantes, cargas (queso, chocolate, etc.), ácido

péctico y sus sales, ácido algínico y sus sales, ácidos orgánicos, espesantes coloidales protectores, modificadores del pH, estabilizantes, conservantes, glicerina, alcoholes, y agentes de carbonatación para bebidas carbonatadas. Para su uso en zumos naturales de fruta, bebidas a base de zumos de fruta, o bebidas vegetales, la composición de la presente invención puede contener adicionalmente pulpa de fruta. Estos aditivos se pueden usar por separado o en combinación. Normalmente, si bien no es relevante, las cantidades de los aditivos son del orden de 0 a 20 partes en peso por 100 partes en peso de la composición.

Efectos ventajosos de la invención

Los extractos herbarios mixtos de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 tienen efectos sinérgicos sobre el aumento de la cantidad del factor de crecimiento nervioso (NGF) *in vivo*, el aumento de la proliferación de células neuronales, la promoción de la formación de neuritas y la potenciación de las capacidades cognitivas. Por tanto, los extractos herbarios de la presente invención se pueden usar para una composición farmacéutica y un alimento saludable a fin de prevenir o mejorar trastornos neurodegenerativos.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una fotografía de un tejido cerebral de la región del hipocampo que ilustra el resultado de la evaluación del efecto secretor del factor de crecimiento nervioso usando inmunoquímica NGF de acuerdo con el Ejemplo 1.

Modo de la invención

La presente invención se describirá ahora con más detalle por medio de ejemplos. Será obvio para los expertos en la materia que estos ejemplos se pretende que sean más concretamente ilustrativos y que el alcance de la presente invención, tal y como se expone en las reivindicaciones adjuntas, no se vea limitado al ejemplo ni limitado por el mismo.

<Ejemplo 1> Preparación de extractos herbarios mixtos de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica*.

Se adquirieron *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica*, ambas en estado seco, en una tienda de hierbas medicinales en el mercado de Kyoungdong, Corea. Una vez que se eliminaron las impurezas de las mismas, las hierbas se cortaron con una cuchilla y se mezclaron en una relación en 3,5:1 de *Dioscorea Rhizoma* : *Dioscorea nipponica*. A 2 kg de la mezcla se añadieron 10 l de una solución de etanol al 50 %, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 48 horas con agitación. La mezcla herbaria se retiró mediante filtración, y el filtrado se concentró al vacío y se liofilizó para dar una extracto herbario mixto (extracto bruto) (véase la Tabla 1).

Tabla 1

[Tabla 1]

Rendimiento de los extractos herbarios mixtos									
	Cantidad		Disolvente	Cantidad de disolvente	Lavado	Temperatura de extracción	Tiempo de extracción	Resultado (g)	Rendimiento (%)
	<i>D. Rhizoma</i>	<i>D. nipponica</i>							
Ejemplo 1	1,55 kg	0,45 kg	EtOH 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	212,85	10,64

<Ejemplos Comparativos 1 y 2> Preparación de extractos herbarios en bruto

1. Preparación de un extracto bruto de *Dioscorea Rhizoma*

- 5 A 2 kg de la misma *Dioscorea Rhizoma* usada en el Ejemplo 1 y agitados 2 kg de la misma *Dioscorea Rhizoma* usada en el Ejemplo 1 se añadieron 10 l de solución de etanol al 50 % agitada durante 48 horas a temperatura ambiente. El extracto bruto de *Dioscorea Rhizoma* se obtuvo finalmente mediante liofilización tras la extracción, filtración y concentración a presión reducida (véase la Tabla 2).

10 Tabla 2

[Tabla 2]

Rendimiento del extracto de <i>Dioscorea Rhizoma</i>								
	Cantidad de hierba	Disolvente	Cantidad de disolvente	Lavado	Temperatura de extracción	Tiempo de extracción	Resultado (g)	Rendimiento (%)
Ejemplo Comparativo 1	2 kg	EtOH 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	253,8	12,69

2. Preparación de un extracto bruto de *Dioscorea nipponica*

- 15 Se añadieron 10 l de una solución de etanol al 50 % a 2 kg de *Dioscorea nipponica* usada en el Ejemplo 1 y se agitó durante 48 horas a temperatura ambiente. El extracto bruto de *Dioscorea nipponica* se obtuvo finalmente mediante liofilización tras la extracción, filtración y concentración a presión reducida. (Véase la Tabla 3).

20 Tabla 3

[Tabla 3]

Rendimiento del extracto de <i>Dioscorea nipponica</i>								
	Cantidad de hierba	Disolvente	Cantidad de disolvente	Lavado	Temperatura de extracción	Tiempo de extracción	Resultado (g)	Rendimiento (%)
Ejemplo Comparativo 2	2 kg	EtOH 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	160	8,00

<Ejemplos Comparativos 3 a 10> Preparación de un extracto herbario mixto de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica*

- 25 Se usaron las mismas hierbas *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* que las usadas en el Ejemplo 1. Se cortaron la *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* con una cuchilla y se mezclaron en las relaciones en peso enumeradas en la Tabla 4. A 2 kg de cada una de las mezclas se añadieron 10 l de una solución de etanol al 50 %, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 48 horas con agitación. Las mezclas de hierbas se retiraron mediante filtración, y el filtrado se concentró al vacío y se liofilizó para dar extractos herbarios mixtos (extractos en bruto). (Véase la Tabla 4).

35 Tabla 4

[Tabla 4]

Rendimiento de los extractos herbarios mixtos									
	Cantidad		Disolvente	Cantidad de disolvente	Lavado	Temperatura de extracción	Tiempo de extracción	Resultado (g)	Rendimiento (%)
	<i>D. Rhizoma</i>	<i>D. nipponica</i>							
Ejemplo Comparativo 3	1	1	EtOH 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	179,05	8,95
Ejemplo Comparativo 4	1,33	0,67	EtOH 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	135,96	6,80
Ejemplo Comparativo 5	1,67	0,33	EtOH 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	160,07	8,00
Ejemplo Comparativo 6	1,82	0,18	EtOH 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	138,75	6,93
Ejemplo Comparativo 7	0,67	1,33	EtOH 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	153,56	7,68
Ejemplo Comparativo 8	0,45	1,55	EtOH 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	139,15	6,96
Ejemplo Comparativo 9	0,33	1,67	EtOH 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	181,06	9,05
Ejemplo Comparativo 10	0,18	1,82	EtOH 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	146,43	7,32

<Ejemplo experimental 1> Efecto de los extractos herbarios sobre el aumento de la secreción del factor de crecimiento nervioso

5 Los efectos del aumento y potenciación de la secreción del NGF por el Ejemplo 1 se identificaron usando glioma C6, una cepa de células de neuroglioma de ratas que producen NGF. Los ejemplos comparativos 1 a 10 eran los grupos de control de este experimento.

10 Se cultivaron células C6 en placas de cultivo celular de 24 pocillos con medio DMEM (añadiendo FBS al 5 %, L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1 mM, 50 µg de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina;) a 37 °C y en CO₂ al 5 %. Tras ajustar las células cultivadas a concentraciones de 2×10^5 células/pocillo, el Ejemplo 1, los Ejemplos Comparativos 1 a 10 se trataron con 100, 250, y 500 µg/ml. En las mismas condiciones de cultivo, las células se cultivaron durante 2 días y después se midió la concentración de NGF en el medio usando ELISA. (Véase la Tabla 5).

15 Tabla 5

[Tabla 5]

Efectos sobre el aumento de la secreción del NGF			
	<i>D. Rhizoma:D.nipponica</i> en comparación con el peso total	Concentración (µg/ml)	Concentración de NGF (% de control)
Ejemplo 1	3,5:1	100	122
		250	149
		500	156
Ejemplo Comparativo 1	Extracto bruto de <i>D. Rhizoma</i>	100	112
		250	126
		500	135
Ejemplo Comparativo 2	Extracto bruto de <i>D. nipponica</i>	100	102
		250	121
		500	130
Ejemplo Comparativo 3	1:1	100	108
		250	124
		500	141
Ejemplo Comparativo 4	2:1	100	117
		250	131
		500	136:
Ejemplo Comparativo 5	5:1	100	115
		250	129
		500	134
Ejemplo Comparativo 6	10:1	100	112
		250	129
		500	134
Ejemplo Comparativo 7	1:2	100	107
		250	116
		500	129
Ejemplo Comparativo 8	1:3,5	100	106
		250	118
		500	130

Efectos sobre el aumento de la secreción del NGF			
	<i>D.Rhizoma:D.nipponica</i> en comparación con el peso total	Concentración (µg/ml)	Concentración de NGF (% de control)
Ejemplo Comparativo 9	1:5	100	107
		250	116
		500	126
Ejemplo Comparativo 10	1:10	100	105
		250	116
		500	125

Como se muestra en la Tabla 5, la concentración de NGF aumentó de acuerdo con la concentración de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica*. Asimismo, se demostró que la concentración de NGF en *Dioscorea Rhizoma* (Ejemplo Comparativo 1) era mayor que en *Dioscorea nipponica* (Ejemplo Comparativo 2), de modo que el primero mostraba un efecto más significativo.

Aunque la concentración de *Dioscorea Rhizoma* inyectada al Ejemplo 1 (*D.Rhizoma:D.nipponica* = 155:45) era un 25 % menor que la del Ejemplo Comparativo 1 (*D. Rhizoma* 200), el contenido de NGF aumentó de un 8,9 a un 15,5 % a la misma concentración.

Asimismo, la concentración de NGF en el Ejemplo 1 aumentó más, de aproximadamente un 4,2 a un 16,4 % que en el Ejemplo Comparativo 5 (*D.Rhizoma:D.nipponica* = 167:33, 5:1) en el que se inyectó un 7,7 % más de *Dioscorea Rhizoma* y aumentó más, de aproximadamente un 8,9 a un 16,4 %, que en el Ejemplo Comparativo 6 (*D.Rhizoma:D.nipponica* = 182:18, 10:1) en el que se inyectó un 17,4 % más de *Dioscorea Rhizoma*. La cantidad de NGF en el Ejemplo 1 aumentó más, de aproximadamente un 4,4 a un 12,9 % que en el Ejemplo Comparativo 4 (*D.Rhizoma:D.nipponica* = 133:67, 2:1) en el que se inyectó un 14,2 % menos de *Dioscorea Rhizoma*. Se demostró el aumento significativo del contenido de NGF con respecto a otros Ejemplos Comparativos.

Por tanto, se ha encontrado que una composición farmacéutica para los trastornos de la presente invención que comprende un extracto mixto de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 puede aumentar la concentración de NGF eficazmente en comparación con otras relaciones de mezclado. Así pues, se podría usar para el tratamiento o la prevención de trastornos neurodegenerativos.

En lo sucesivo en el presente documento, se ensayan comparativamente los efectos potenciadores sobre la proliferación celular, la formación de neuritas y las capacidades cognitivas de acuerdo con el contenido de NGF en los extractos herbarios de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica*. Por tanto, se discutirá la capacidad para la prevención o el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

<Ejemplo experimental 2> Efecto de los extractos herbarios sobre la mejora de las capacidades cognitivas

Se usaron ratones ICR (machos, 6 semanas de edad, 25-28 g) proporcionados por Daehan Biolink (Chungbuk, Corea) después de 7 días de cría y adaptación en jaulas limpias de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Kyunghee. Se les permitió el acceso libre a comida (Daehan Biolink, Chungbuk, Corea) y agua. La temperatura (22 ± 2 °C), la humedad (53 ± 3 %) y el ciclo de luz y oscuridad (12 horas) se controlaron automáticamente.

Se asignaron a cada grupo 10 ratones. Se administró solución salina por vía oral a los ratones del grupo de control a 5 ml por kg de peso. Se administraron por vía oral a los ratones del grupo de tratamiento 10 y 100 mg/kg del Ejemplo 1 y de los Ejemplos Comparativos 1 a 10, respectivamente disueltos en solución salina. La administración oral se efectuó una vez al día y 1 hora después de la última administración oral se realizó un ensayo de evitación pasiva tal como sigue.

El ensayo de evitación pasiva se realizó en una caja de lanzadera A modificada con dos compartimentos comunicantes (7 x 7 cm puerta deslizante construida en el muro de separación) de igual tamaño y se usó un suelo de barras de acero inoxidable. El compartimento de la derecha (compartimento de choque) se pintó de negro para obtener una cámara oscura. El compartimento de la izquierda se iluminó con una bombilla (24 V; 5 W) instalada sobre la cubierta superior de Plexiglás. El primer día, una luz se encendió en la cámara iluminada y se apagó en la cámara oscura. Y los inventores abrieron la puerta de guillotina tras dejar que los ratones estuvieran en la cámara iluminada durante 10 segundos y midieron el tiempo hasta que los ratones entraron en la cámara oscura. Cuando los ratones se movieron a la cámara oscura la puerta de guillotina se cerró y se les aplicó una estimulación eléctrica de 0,3 mA durante 3 segundos. Al cabo de 24 h, el ensayo de evitación pasiva se realizó con el mismo método y se midió el tiempo de latencia de estancia en la cámara iluminada. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6

[Tabla 6]

Efecto sobre la mejora de las capacidades cognitivas en un ensayo de evitación pasiva			
	<i>D.Rhizoma:D.nipponica</i> en comparación con el peso total	Cantidad (mg/kg)	Tiempo de latencia (s)
Grupo de control		-	166,18 ± 13,83
Ejemplo 1	3,5:1	10	220,17 ± 25,63
		100	275,87 ± 25,40
Ejemplo Comparativo 1	Extracto bruto de <i>D. Rhizoma</i>	10	202,84 ± 19,65
		100	225,28 ± 20,21
Ejemplo Comparativo 2	Extracto bruto de <i>D. nipponica</i>	10	199,62 ± 17,01
		100	218,24 ± 18,47
Ejemplo Comparativo 3	1:1	10	194,86 ± 9,43
		100	204,19 ± 10,72
Ejemplo Comparativo 4	2:1	10	202,69 ± 11,24
		100	231,42 ± 16,55
Ejemplo Comparativo 5	5:1	10	211,43 ± 18,21
		100	235,71 ± 21,60
Ejemplo Comparativo 6	10:1	10	205,33 ± 15,08
		100	219,93 ± 16,14
Ejemplo Comparativo 7	1:2	10	186,72 ± 1061
		100	204,68 ± 14,32
Ejemplo Comparativo 8	1:3,5	10	196,93 ± 16,58
		100	209,61 ± 14,41
Ejemplo Comparativo 9	1:5	10	205,89 ± 12,60
		100	215,99 ± 18,96
Ejemplo Comparativo 10	1:10	10	193,53 ± 16,08
		100	211,74 ± 20,57

5 Como se muestran en la Tabla 6, la latencia de retención en el grupo al que se administró *Dioscorea Rhizoma* era mayor que en el grupo al que se administró *Dioscorea nipponica*, el Ejemplo 1 (*D.Rhizoma:D.nipponica*=155:45) aumentaba la latencia de retención de un 8,9 a un 22,2 % respecto al Ejemplo Comparativo 1 (*D. Rhizoma* 200), aunque al Ejemplo 1 se le administró un 25 % menos de *Dioscorea Rhizoma* que al Ejemplo Comparativo 1 (*D. Rhizoma* 200).

10 Asimismo, el tiempo de latencia de acuerdo con el Ejemplo 1 aumentó de un 4,2 a un 19 % respecto al Ejemplo Comparativo 5 (*D.Rhizoma:D.nipponica* = 167:33, 5:1) en el que se inyectó un 7,7 % más de *Dioscorea Rhizoma* y aumentó más, de aproximadamente un 7,3 a un 25,6 %, que en el Ejemplo Comparativo 6 (*D.Rhizoma:D.nipponica* = 182:18, 10:1) en el que se inyectó un 17,4 % más de *Dioscorea Rhizoma*. El tiempo de latencia de acuerdo con el

15 Ejemplo 1 aumentó de un 8,9 a un 19 % respecto al Ejemplo Comparativo 4 (*D.Rhizoma:D.nipponica* = 133:67, 2:1) en el que se inyectó un 14,2 % menos de *Dioscorea Rhizoma*. Se demostró que la memoria aumentaba significativamente con respecto a los otros Ejemplos Comparativos.

20 Por tanto, se ha encontrado que una composición farmacéutica para los trastornos de la presente invención que comprende un extracto mixto de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 tiene el efecto de mejorar las capacidades cognitivas en comparación con otras relaciones de mezclado.

<Ejemplo experimental 3> Efecto de los extractos herbarios sobre la potenciación de la generación de neuronas

Se extirpó el hipocampo de los ratones de cada grupo una vez completado el Ejemplo experimental 2. Después de deshidratar el hipocampo extirpado con peróxido de hidrógeno, se hizo reaccionar con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU, Santa Cruz, producido en rata 1:500) como primer anticuerpo durante una noche. Y a continuación, se usó anti-rata biotinilada (vector, producido en cabra) como segundo anticuerpo y se desarrolló el color usando diaminobencidina tras la reacción con ABC (kit ABC, vector). El efecto de potenciación de la generación de células neuronales se identificó mediante recuento de las células BrdU positivas en el área del giro dentado del hipocampo. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7

[Tabla 7]

Efecto de potenciación de la generación de células			
	<i>D. Rhizoma</i> : <i>D. nipponica</i> en comparación con el peso total	Cantidad (mg/kg)	Células BrdU positivas (% del control)
Ejemplo 1	3,5:1	10	153,79 ± 15,24
		100	158,59 ± 9,45
Ejemplo Comparativo 1	Extracto bruto de <i>D. Rhizoma</i>	10	123,81 ± 10,14
		100	129,42 ± 11,36
Ejemplo Comparativo 2	Extracto bruto de <i>D. nipponica</i>	10	118,60 ± 8,37
		100	121,59 ± 8,13
Ejemplo Comparativo 3	1:1	10	124,25 ± 10,93
		100	125,86 ± 9,06
Ejemplo Comparativo 4	2:1	10	128,44 ± 11,65
		100	136,70 ± 13,28
Ejemplo Comparativo 5	5:1	10	129,54 ± 12,91
		100	134,08 ± 14,61
Ejemplo Comparativo 6	10:1	10	121,08 ± 9,54
		100	128,57 ± 11,77
Ejemplo Comparativo 7	1:2	10	120,68 ± 9,27
		100	124,16 ± 11,36
Ejemplo Comparativo 8	1:3,5	10	126,39 ± 11,17
		100	130,28 ± 13,49
Ejemplo Comparativo 9	1:5	10	124,70 ± 10,25
		100	128,06 ± 11,59
Ejemplo Comparativo 10	1:10	10	121,84 ± 13,18
		100	124,12 ± 12,85

Como se muestra en la Tabla 7, la *Dioscorea Rhizoma* (Ejemplo 1) mostraba un mayor número de células BrdU positivas que la *Dioscorea nipponica* (Ejemplo Comparativo 2) cuando se contaron las células BrdU positivas en el área del giro dentado del hipocampo. Aunque la cantidad de *Dioscorea Rhizoma* inyectada en el Ejemplo 1 era un 25 % menor que en el Ejemplo Comparativo 1, el número de células BrdU positivas era aproximadamente un 25 % mayor.

Además, el número de células BrdU positivas era aproximadamente un 25 % mayor en el Ejemplo 1 que en el Ejemplo Comparativo 5 en el que se inyectó un 7,7 % más de *Dioscorea Rhizoma* que en el Ejemplo 1 y que en el Ejemplo Comparativo 6 en el que se inyectó un 17,4 % más de *Dioscorea Rhizoma* que en el Ejemplo 1. El número de células BrdU positivas era aproximadamente un 20 % mayor en el Ejemplo 1 que en el Ejemplo Comparativo 4 en

el que se inyectó un 14,2 % menos de *Dioscorea Rhizoma* que en el Ejemplo 1. Esto demostró el aumento significativo del número de células BrdU positivas con respecto a los otros Ejemplos Comparativos.

Por tanto, se ha encontrado que una composición farmacéutica para los trastornos de la presente invención que comprende un extracto mixto de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 tiene el efecto de potenciar la generación de células neuronales en el área del giro dentado en comparación con otras relaciones de mezclado.

<Ejemplo experimental 4> Efecto de los extractos herbarios sobre la diferenciación de las células neuronales y la potenciación del crecimiento de neuritas

Se extirpó el hipocampo de los ratones de cada grupo una vez completado el Ejemplo experimental 2. Después de deshidratar el hipocampo extirpado con peróxido de hidrógeno, se hizo reaccionar con doblecortina (DCX, Santa Cruz, producido en cabra 1:500) como primer anticuerpo durante una noche. Y a continuación, se usó anti-cabra biotinilada (vector, producido en caballo) como segundo anticuerpo y se desarrolló el color usando diaminobencidina tras la reacción con ABC (kit ABC, vector). El efecto sobre la diferenciación celular y la potenciación del crecimiento de neuritas se identificó mediante recuento de las células CDX positivas en el área del giro dentado del hipocampo. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8

[Tabla 8]

Efecto sobre la diferenciación celular y la potenciación del crecimiento de neuritas				
	<i>D.Rhizoma:D.nipponica</i> en comparación con el peso total	Cantidad (mg/kg)	Células CDX positivas (% del control)	Longitud de la neurita (% del control)
Ejemplo 1	3,5:1	10	156,24 ± 9,40	125,38 ± 2,82
		100	183,04 ± 12,67	142,59 ± 1,66
Ejemplo Comparativo 1	Extracto bruto de <i>D. Rhizoma</i>	10	126,84 ± 7,05	115,42 ± 3,60
		100	132,81 ± 9,69	121,34 ± 2,56
Ejemplo Comparativo 2	Extracto bruto de <i>D. nipponica</i>	10	118,60 ± 8,37	120,48 ± 3,74
		100	121,59 ± 8,13	120,57 ± 2,36
Ejemplo Comparativo 3	1:1	10	127,19 ± 7,23	120,48 ± 3,74
		100	132,16 ± 9,61	129,63 ± 2,16
Ejemplo Comparativo 4	2:1	10	130,80 ± 8,67	124,08 ± 2,48
		100	141,64 ± 7,85	181,75 ± 1,81
Ejemplo Comparativo 5	5:1	10	132,54 ± 10,34	121,64 ± 1,34
		100	144,10 ± 9,32	130,12 ± 2,73
Ejemplo Comparativo 6	10:1	10	127,06 ± 11,46	123,39 ± 1,89
		100	138,42 ± 9,29	129,61 ± 2,48
Ejemplo Comparativo 7	1:2	10	125,47 ± 14,38	119,42 ± 1,99
		100	131,37 ± 11,94	126,74 ± 2,65
Ejemplo Comparativo 8	1:3,5	10	126,88 ± 10,43	120,74 ± 1,84
		100	133,05 ± 9,59	122,38 ± 1,69
Ejemplo Comparativo 9	1:5	10	130,15 ± 9,29	125,42 ± 2,88
		100	135,53 ± 10,74	131,41 ± 2,15
Ejemplo Comparativo 10	1:10	10	124,06 ± 9,86	121,72 ± 1,61
		100	126,91 ± 10,34	124,63 ± 2,83

Como se muestra en la Tabla 8, en el área del giro dentado del hipocampo, la *Dioscorea Rhizoma* (Ejemplo 1) mostraba un mayor número de células DCX positivas y una mayor longitud de las neuritas DCX positivas neuritas que la *Dioscorea nipponica*. (Ejemplo Comparativo 2). Aunque la cantidad de *Dioscorea Rhizoma* que se inyectó en el Ejemplo 1 era un 25 % menor que en el Ejemplo Comparativo 1, el número de células DCX positivas y la longitud de las neuritas DCX positivas era aproximadamente de un 25 a un 40 % mayor y de un 1,6 a un 17,3 % mayor, respectivamente.

Además, el número de células DCX positivas y la longitud de las neuritas DCX positivas era aproximadamente de un 18 a un 27 % mayor y de un 3,3 a un 9,2 % mayor, respectivamente, en el Ejemplo 1 que en el Ejemplo Comparativo 5 (en el que se inyectó un 7,7 % más de *Dioscorea Rhizoma* que en el Ejemplo 1). El número de células DCX positivas y la longitud de las neuritas DCX positivas era aproximadamente de un 22,8 a un 32,6 % mayor y de un 3,3 a un 10 % mayor, respectivamente, en el Ejemplo 1 que en el Ejemplo Comparativo 6 (en el que se inyectó un 17,4 % más de *Dioscorea Rhizoma* que en el Ejemplo 1). El número de células DCX positivas y la longitud de las neuritas DCX positivas era aproximadamente de un 20 a un 30 % mayor y de un 1 a un 8 % mayor, respectivamente, en el Ejemplo 1 que en el Ejemplo Comparativo 4 (en el que se inyectó un 14,2 % menos de *Dioscorea Rhizoma* que en el Ejemplo 1). Esto demostró el aumento significativo del número de células DCX positivas y de la longitud de las neuritas DCX positivas con respecto a los otros Ejemplos Comparativos.

Por tanto, se ha encontrado que una composición farmacéutica para los trastornos de la presente invención que comprende un extracto mixto de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 tiene efectos sobre la diferenciación de las células neuronales y potencia el crecimiento de neuritas en el área del giro dentado en comparación con otras relaciones de mezclado.

<Ejemplo experimental 5> Efecto de los extractos herbarios sobre la potenciación de la secreción de NGF *in vivo*

Se extirpó el hipocampo de los ratones del grupo de control y del grupo de tratamiento, a los que se les inyectó el extracto mixto (extracto *D.Rhizoma:D.nipponica* = 3,5:1), una vez completado el Ejemplo experimental 2. Se hizo reaccionar con anti-factor de crecimiento nervioso (NGF, Abcam, producido en conejo 1:500) como primer anticuerpo durante una noche, y después se usó anti-rata biotinilada (vector, producido en cabra) como segundo anticuerpo. Tras esto, se formuló un color fluorescente usando estreptavidina tras la reacción con ABC (kit ABC, vector). El efecto de potenciación de la secreción del NGF se identificó mediante recuento de las células NGF positivas en el área del giro del hipocampo. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Como se muestra en la Figura 1, los extractos herbarios del Ejemplo 1 tienen un efecto significativo sobre la potenciación de la secreción de NGF en el hipocampo.

Por tanto, se ha encontrado que una composición farmacéutica de la presente invención que comprende un extracto mixto de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 tiene un efecto sinérgico en comparación con otras relaciones de mezclado. Así pues, se puede usar una composición farmacéutica de la presente invención para la prevención o el tratamiento de trastornos neurodegenerativos que incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, la enfermedad de Huntington, la esclerosis múltiple, el síndrome de Guillain-Barre, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Lou Gehrig, la demencia parálitica causada por la muerte gradual de neuronas, enfermedades causadas por incontinencia progresiva, anomalías de la postura y el ejercicio, ataxia progresiva, debilidad y atrofia muscular, y trastornos del movimiento y las sensaciones.

Se describirá ahora con más detalle la composición que comprende los extractos herbarios divulgados en el Ejemplo 1 mediante Ejemplos de Formulación. No hay ninguna intención de limitar las reivindicaciones sino de explicarlas específicamente.

Ejemplo de Formulación 1. Preparación de la inyección

Extracto del Ejemplo 1	100 mg
Metabisulfito sódico	3,0 mg
Metilparabeno	0,8 mg
Propilparabeno	0,1 mg
Agua estéril para inyección	c.s.

A una mezcla de los ingredientes se añadió agua estéril para formar un volumen total de 2 ml, y la solución se cargó en una ampolla de 2 ml y se esterilizó para dar una inyección.

Ejemplo de Formulación 2. Preparación de un comprimido

Extracto del Ejemplo 1	200 mg
Lactosa	100 mg
Almidón	100 mg
Esterarato Mg	c.s.

5 Los ingredientes se mezclaron y se comprimieron para dar un comprimido mediante un método de formación de comprimidos.

Ejemplo de Formulación 3. Preparación de una cápsula

Extracto del Ejemplo 1	100 mg
Lactosa	50 mg
Almidón	50 mg
Talco	2 mg
Esterarato Mg	c.s.

10 Los ingredientes se mezclaron y se cargaron en una cápsula de gelatina de acuerdo con un método normal para dar una cápsula.

Ejemplo de Formulación 4. Preparación de un líquido

Extracto del Ejemplo 1	1000 mg
Azúcar	20 g
Isomerasa	20 g
Aroma de limón	c.s.

15 Se añadió agua purificada para formar un volumen total de 100 ml.

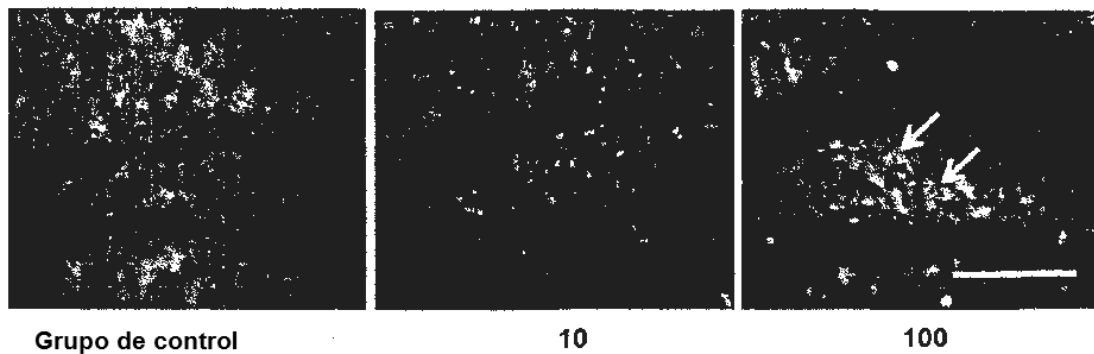
Los ingredientes anteriores se mezclaron, se cargaron en un vial marrón de 100 ml y se esterilizaron para dar una formulación líquida.

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, que comprende extractos herbarios mixtos de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 (p/p) como principio activo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable,
5 en la que la *Dioscorea Rhizoma* es un rizoma fresco de *Dioscorea batatas Decaisne* o *Dioscorea japonica Thunberg*, o un rizoma fresco de *Dioscorea batatas Decaisne* o *Dioscorea japonica Thunberg* que se ha tratado con vapor y secado.
- 10 2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el trastorno neurodegenerativo se selecciona entre el grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, la enfermedad de Huntington, la esclerosis múltiple, el síndrome de Guillain-Barre, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Lou Gehrig, la demencia parálitica causada por la muerte gradual de neuronas y enfermedades causadas por incontinencia progresiva.
- 15 3. Una composición para alimentos funcionales saludables para su uso en la prevención o el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, que comprende extractos herbarios mixtos de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una relación en peso de 3,5:1 (p/p),
20 en la que la *Dioscorea Rhizoma* es un rizoma fresco de *Dioscorea batatas Decaisne* o *Dioscorea japonica Thunberg*, o un rizoma fresco de *Dioscorea batatas Decaisne* o *Dioscorea japonica Thunberg* que se ha tratado con vapor y secado.
4. La composición para alimentos funcionales saludables para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que los extractos herbarios son extractos herbarios en bruto extraídos usando un 50 % de etanol.
- 25 5. La composición para alimentos funcionales saludables para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que los extractos herbarios se preparan en una forma seleccionada entre un polvo, un gránulo, un comprimido, una cápsula, un jarabe y una bebida.

[Fig. 1]



Los extractos herbarios mixtos de *D. Rhizoma* : *D. Nipponica* 3,5:1