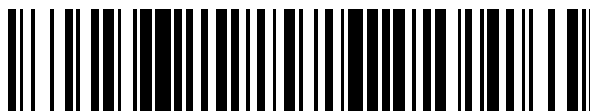


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 055**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/65** (2006.01)  
**A61K 36/232** (2006.01)  
**A61K 36/233** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2015 PCT/KR2015/009717**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2016 WO16043517**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2015 E 15842648 (6)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3199171**

54 Título: **Composición farmacéutica para tratar y prevenir trastornos neurológicos degenerativos, que contiene, como principio activo, extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana o una fracción del mismo**

30 Prioridad:

**19.09.2014 KR 20140124860**  
**15.09.2015 KR 20150130107**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.07.2019**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY (50.0%)  
 International Campus 1732 Deogyong-daero Giheung-gu  
 Yongin-si, Gyeonggi-do 17104, KR y  
 DONG-A ST CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KIM, YOUNGMI;  
 OH, MYUNG SOOK;  
 HONG, SEON-PYO;  
 SOHN, MI WON;  
 JEONG, JIN SEOK;  
 JIANG, HAI HUA;  
 KIM, EUNJIN;  
 RYU, JA YOUNG;  
 CHO, YOUNG WOONG;  
 DU, XIAO FEI;  
 CHOI, SANG ZIN;  
 KIM, JEONG SOO y  
 KIM, BYOUNG MOON**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 720 055 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 farmacéutica para tratar y prevenir trastornos neurológicos degenerativos, que contiene, como principio activo, extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana o una fracción del mismo

### 5 Antecedentes de la invención

#### 1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica como se desvela en las reivindicaciones.

#### 2. Descripción de la técnica relacionada

10 En las últimas dos décadas, los pacientes con trastornos neurológicos degenerativos se han incrementado rápidamente en el mundo. En el tratamiento del trastorno neurológico degenerativo, la etapa más importante es la prevención. Sin embargo, la causa de la enfermedad aún no se ha entendido claramente y, por lo tanto, todavía es necesario estudiar un procedimiento de tratamiento. El fenómeno patológico común de los trastornos neurológicos degenerativos es la muerte de las células del sistema nervioso central. A diferencia de otras células orgánicas, las células del sistema nervioso central son casi imposibles de regenerar después de la muerte celular, lo que da como resultado una pérdida permanente de la función. Los procedimientos para el tratamiento de dichas enfermedades cerebrales desarrollados hasta ahora se centran principalmente en el análisis del mecanismo de muerte de las propias células nerviosas y la prevención de la muerte basada en el análisis. De acuerdo con los resultados de estudios básicos y clínicos recientes sobre la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, la reacción inflamatoria en el cerebro es una causa importante de muerte neuronal. En realidad, el aumento de los mediadores de la inflamación y el oxígeno reactivo se ha confirmado en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con enfermedad cerebral. Asimismo, se observan cantidad células microgliales activas en la zona de daño cerebral, lo que indica que la inflamación cerebral es una causa principal de la enfermedad de Parkinson. Por lo tanto, la inhibición de la inflamación cerebral por las células neurogliales se ha convertido en una diana del tratamiento del trastorno neurológico degenerativo. Sin embargo, los agentes terapéuticos que se han desarrollado hasta ahora solo son eficaces para regular los síntomas de la enfermedad, pero no son eficaces para tratar el trastorno neurológico degenerativo en sí. Muchos contaminantes ambientales a los que se está constantemente expuesto en la sociedad moderna y la mutación de los genes resultante de los contaminantes causan trastornos neurológicos degenerativos. Por lo tanto, se requiere desarrollar un agente preventivo y terapéutico para el trastorno neurológico degenerativo basado en un concepto totalmente diferente de los convencionales.

30 El trastorno neurológico degenerativo incluye enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, apoplejía, enfermedad de Huntington y lesión de la médula espinal, etc. Entre esas enfermedades, la enfermedad de Parkinson es el segundo trastorno neurológico degenerativo más común que afecta al 1 ~ 2 % de los coreanos mayores de 60 años y al 4 ~ 5 % de los coreanos mayores de 85 años. La enfermedad de Parkinson está aumentando rápidamente en las personas de mediana edad de Corea, de 40 ~ 50 años recientemente. En un informe anterior, la enfermedad de Parkinson parecía ser inducida por la falta de dopamina como resultado de la muerte de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra y el cuerpo estriado en el mesencéfalo. La razón de la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas no se ha explicado todavía. Por consiguiente, todavía no se han desarrollado un agente de tratamiento eficaz y un reactivo de diagnóstico. La enfermedad de Parkinson presenta síntomas tales como rostro inexpresivo, rigidez, temblor, postura encorvada y bradicinesia.

40 Recientemente se ha propuesto que el mal funcionamiento de las mitocondrias podría ser la causa de diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Parkinson. Como los genes causantes de la enfermedad de Parkinson familiar (EP familiar), se identificaron genes implicados en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la proteólisis tales como PARK1/4 ( $\alpha$ -sinucleína), PARK2 (parkina), PARK6 (cinasa putativa 1 inducida por PTEN, PINK1), PARK7 (DJ-1) y PARK8 (cinasa 2 rica en leucina, LRRK2) existentes en la membrana externa de las mitocondrias, y PARK13 (HTRA2/OMI) existente en la membrana interna de las mitocondrias (Nat Clin. Pract. Neurol 2, 136-146, 2006). PINK1, parkina y DJ-1 están implicados en acciones en dinámicas mitocondriales tales como la fisión y la fusión para respaldar la estructura de la red de mitocondrias (PLoS Biol. 6, e1000298, 2010).

50 La enfermedad de Parkinson esporádica (EP esporádica) que supone el 95 % de toda la enfermedad de Parkinson también se caracteriza por un deterioro de la actividad mitocondrial. Los insecticidas/herbicidas tales como paraquat y rotenona se conocen como un material que causa daños a la actividad de las mitocondrias al suprimir el sistema de transporte de electrones de las mitocondrias. La MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) usada para establecer el modelo animal de la enfermedad de Parkinson y su metabolito MPP+ se conocen como inhibidores selectivos del complejo 1 del sistema de transporte de electrones de la mitocondria. Este ejemplo sugiere que la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas debido a una disfunción mitocondrial puede ser una causa de la enfermedad de Parkinson y, al mismo tiempo, la recuperación de la actividad mitocondrial puede ser una diana importante para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

El retículo endoplasmático, un orgánulo intracelular, se clasifica en retículo endoplasmático rugoso (RE rugoso, RER)

con ribosomas unidos y retículo endoplasmático liso (RE liso, REL). La función principal del retículo endoplasmático rugoso es la síntesis de proteínas. Aproximadamente 1/3 de las proteínas intracelulares se sintetizan en el retículo endoplasmático rugoso. Mientras tanto, diversos lípidos y hormonas esteroides se sintetizan en un retículo endoplasmático liso. El RE liso también juega un papel importante en la regulación de la concentración de calcio intracelular. Sin embargo, el plegamiento anormal de proteínas debido a diversas razones causa el daño funcional del retículo endoplasmático, que se denomina estrés del retículo endoplasmático. Cuando el estrés del retículo endoplasmático continúa, la apoptosis y la formación masiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) se incrementan a través de diversas transducciones de señales, lo que da como resultado daño celular. También se ha notificado que el estrés del retículo endoplasmático es también una causa de trastornos neurológicos degenerativos tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, apoplejía, enfermedad de Huntington y lesión de la médula espinal, junto con síndrome metabólico, diabetes mellitus, obesidad y dislipemia mediada por el daño de la mitocondria (Lindholm y col., 2006; Penas y col., 2007; Yoshida, 2007; Zhang y col., 2006).

La corteza de raíz de peonía (*Moutan Radicis Cortex*) es la corteza de la raíz de *Paeonia suffruticosa* Andrews, que es un medicamento herbario que contiene paeonol, paeoniflorina, oxipaeoniflorina y ácido gálico o paeoniflorigenona. En la medicina oriental, se sabe que la corteza de raíz de peonía es eficaz en relajación, analgesia, antiinflamación y el tratamiento de una enfermedad inflamatoria. Recientemente, se ha sabido que la corteza de raíz de peonía tiene actividades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y antienvjecimiento, y se ha notificado su eficacia para tratar una enfermedad cerebral como un componente de diversas mezclas.

La raíz de angélica china (*Angelicae dahuricae Radix*) es la raíz seca de *Angelica dahurica* Bentham et Hooker f. o *Angelica dahurica* Bentham et Hooker f. var. *formosana* Shan et Yuan, que es una hierba de 2 ~ 3 años de edad que es nativa en Corea, China y Japón. Los principales compuestos bioactivos de la raíz de angélica china son imperatorina, isoimperatorina, oxipoucedanina, felopterina y byakangelicol. En la medicina oriental, se han conocido diversos efectos de la raíz de angélica china. En particular, se sabe que es eficaz para aliviar la sudoración, sedación, dolor, frío, dolor de cabeza o dolor de muelas. Sin embargo, no hay ningún informe sobre la participación de la raíz de angélica china en la mejora de las funciones mitocondriales y el alivio del estrés del retículo endoplasmático para mejorar el efecto de tratamiento de una enfermedad neuronal.

La raíz de hierba gitana (*Bupleuri Radix*) es una hierba medicinal que se refiere a la raíz de *Bupleurum falcatum* Linne o sus variantes (*Umbelliferae*).

Las principales actividades farmacológicas de la raíz de hierba gitana incluyen diversas actividades farmacológicas como las actividades antipiréticas, calmantes, analgésicas, antibacterianas, antivirales y antiinflamatorias. Las principales actividades farmacológicas de la raíz de hierba gitana son las actividades antipiréticas, calmantes, analgésicas, antibacterianas, antivirales y antiinflamatorias.

Los inventores de la presente invención intentaron desarrollar un agente terapéutico para un trastorno neurológico degenerativo a partir de hierbas comestibles. Como resultado, los inventores descubrieron que el extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana tenía la actividad de recuperar el daño funcional de las mitocondrias, de aliviar el estrés del retículo endoplasmático y de inhibir la respuesta inflamatoria simultáneamente, lo que fue significativamente mayor que la de cada extracto individual mostrado. El extracto de la mezcla anterior mejoró significativamente la coordinación motora y mostró un efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas *in vivo* en el modelo de enfermedad de Parkinson, de modo que los inventores de la presente invención confirmaron que el extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana o la fracción del mismo podría ser útil como principio activo de una composición farmacéutica para tratar y prevenir trastornos neurológicos degenerativos, conduciendo a la finalización de la invención.

### **Sumario de la invención**

Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica para tratar o prevenir trastornos neurológicos degenerativos que comprende un extracto de una mezcla de corteza de raíz de peonía (*Moutan Radicis Cortex*), raíz de angélica china (*Angelicae Dahuricae Radix*) y raíz de *Bupleurum* (*Bupleuri Radix*) o una fracción del mismo como principio activo, y un alimento funcional saludable para mejorar o prevenir trastornos neurológicos degenerativos que la comprende.

Con el fin de conseguir el objeto anterior, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar o prevenir trastornos neurológicos degenerativos que comprende un extracto de una mezcla de corteza de raíz de peonía (*Moutan Radicis Cortex*), raíz de angélica china (*Angelicae Dahuricae Radix*) y raíz de hierba gitana (*Bupleuri Radix*) como principio activo.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para tratar o prevenir trastornos neurológicos degenerativos que comprende una fracción de disolvente orgánico del extracto de la mezcla anterior como un principio activo.

La presente invención también proporciona un alimento funcional saludable para mejorar o prevenir trastornos neurológicos degenerativos que comprende un extracto de una mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana como principio activo.

La presente invención también proporciona un alimento funcional saludable para mejorar o prevenir trastornos neurológicos degenerativos que comprende una fracción de disolvente orgánico del extracto de la mezcla anterior como un principio activo.

5 La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar o prevenir trastornos neurológicos degenerativos que comprende la etapa de administrar una dosis farmacéuticamente eficaz de un extracto de una mezcla de corteza de raíz de peonía (Moutan Radicis Cortex), raíz de angélica china (Angelicae Dahuricae Radix) y raíz de hierba gitana (Bupleuri Radix) a un sujeto.

10 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un extracto de una mezcla de corteza de raíz de peonía (Moutan Radicis Cortex), raíz de angélica china (Angelicae Dahuricae Radix) y raíz de hierba gitana (Bupleuri Radix), para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos neurológicos degenerativos.

La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar o prevenir trastornos neurológicos degenerativos que comprende la etapa de administrar una dosis farmacéuticamente eficaz de una fracción de disolvente orgánico del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana a un sujeto.

15 Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una fracción de disolvente orgánico del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana, para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos neurológicos degenerativos.

### **Efectos ventajosos**

20 El extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía (Moutan Radicis Cortex), raíz de angélica china (Angelicae Dahuricae Radix) y raíz de hierba gitana (Bupleuri Radix) podría aumentar el nivel de ATP intracelular, recuperar el potencial de la membrana mitocondrial dañada; y suprimir la generación de ROS con una intensidad hasta 1,5 veces la del extracto individual cuando el daño a la mitocondria funcional, el estrés del retículo endoplasmático y la respuesta inflamatoria se indujeron simultáneamente en el modelo de enfermedad de Parkinson. También se confirmó que el extracto de la mezcla de la presente invención es significativamente eficaz para mejorar la coordinación motora y proteger las neuronas dopaminérgicas en el modelo animal de la enfermedad de Parkinson, de modo que el extracto de la mezcla de la invención o la fracción de la misma se puede usar de manera eficaz como un principio activo de una composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de un trastorno neurológico degenerativo.

### **Breve descripción de los dibujos**

30 La aplicación de las realizaciones preferidas de la presente invención se entiende mejor con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

35 La figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra el procedimiento de construcción del modelo animal de enfermedad de Parkinson a través de la administración de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Particularmente, el extracto en etanol al 90 % liofilizado de una mezcla compuesta de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en una proporción de 1:1:1 se disolvió en HPMC al 3 %, que se administró (por vía oral, v.o.) al ratón de ensayo (1, 3 o 10 mg/kg), una vez al día durante 14 días. A partir del 8º día del experimento, se administró 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (intraperitoneal, i.p.) al ratón a la dosis de 30 mg/kg tres horas después de la administración oral durante 5 días, dando como resultado la construcción del modelo animal de enfermedad de Parkinson. El modelo en ratón preparado se usó para el ensayo de comportamiento. El animal se sacrificó y se realizaron análisis de células y transferencia de Western.

40 La figura 2 es un diagrama esquemático que ilustra el procedimiento de construcción del modelo animal de enfermedad de Parkinson a través de la administración de 6-OHDA (6-hidroxidopamina). Particularmente, se diluyeron 16 µg de 6-OHDA (6-hidroxidopamina) en 2 µl de ácido ascórbico al 0,1 %, que se inyectó una vez mediante cirugía estereotáctica en el animal de ensayo, dando como resultado la construcción del modelo animal de enfermedad de Parkinson. Una semana después de la cirugía, el extracto en etanol al 90 % liofilizado de una mezcla compuesta de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en una proporción de 1:1:1 se disolvió en agua, que se administró (por vía oral, v.o.) al ratón a la dosis de 3 mg/kg una vez al día durante 7 días. El modelo en ratón preparado se usó para el ensayo de comportamiento. El animal se sacrificó y se realizaron análisis de células y transferencia de Western.

50 La figura 3 es un diagrama esquemático que ilustra el procedimiento de construcción del modelo animal de enfermedad de Parkinson a través de la administración de rotenona. Particularmente, el extracto en etanol al 90 % liofilizado de una mezcla compuesta de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en una proporción de 1:1:1 se disolvió en agua, que se administró (por vía oral, v.o.) a la rata a la dosis de 10 mg/kg una vez al día durante 6 semanas. Una semana después de la administración oral, se inyectó rotenona (intraperitoneal, i.p.) a la rata a la dosis de 2,5 mg/kg una vez al día durante 5 semanas, dando como resultado la construcción del modelo animal de enfermedad de Parkinson. El modelo en rata preparado se usó para el ensayo de comportamiento. El animal se sacrificó y se realizaron análisis de células y transferencia de Western.

55 La figura 4 es un diagrama esquemático que ilustra el procedimiento de construcción del modelo animal de enfermedad de Parkinson a través de la administración de LPS (lipopolisacárido). Particularmente, el extracto en

etanol al 90 % liofilizado de una mezcla compuesta de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en una proporción de 1:1:1 se disolvió en agua, que se administró (por vía oral, v.o.) al ratón a la dosis de 10 o 30 mg/kg una vez al día durante 3 días. Después de la última administración, se administró una vez LPS (lipopolisacárido) (intraperitoneal, i.p.) al ratón a la dosis de 5 mg/kg, dando como resultado la construcción del modelo animal de enfermedad de Parkinson. El modelo en ratón preparado se usó para el ensayo de eficacia anti-inflamación del cerebro.

### **Descripción de las realizaciones preferidas**

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describe en detalle.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar o prevenir trastornos neurológicos degenerativos que comprende un extracto de una mezcla de corteza de raíz de peonía (*Moutan Radicis Cortex*), raíz de angélica china (*Angelicae Dahuricae Radix*) y raíz de hierba gitana (*Bupleuri Radix*) como principio activo.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para tratar o prevenir trastornos neurológicos degenerativos que comprende una fracción de disolvente orgánico del extracto de la mezcla corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana como principio activo.

Se prefiere mezclar corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana a la proporción en peso de 1:0,2 ~ 5:0,2 ~ 5 (p:p:p). Más preferentemente corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana se mezclan a la proporción de 1:0,5 ~ 2:0,5 ~ 2 (p:p:p), y de la manera más preferente a la proporción de 1:1:1 (p:p:p), pero sin limitarse siempre a los mismos.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, dos materiales seleccionados entre el grupo que consiste en corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana se mezclan preferentemente a la proporción en peso de 1:0,2 ~ 5 (p:p), más preferentemente a la proporción de 1:0,5 ~ 2 (p:p), y de la manera más preferente a la proporción de 1:1 (p:p), pero sin limitarse siempre a los mismos.

El extracto de la mezcla anterior se extrae preferentemente usando agua, alcohol inferior de C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> o una mezcla de los mismos, como disolvente, y en este momento el alcohol inferior es preferentemente etanol, metanol o butanol.

El extracto de la mezcla se extrae preferentemente de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana. El extracto de la mezcla anterior se prepara preferentemente mediante el procedimiento que comprende las siguientes etapas, pero sin limitarse siempre a las mismas:

- 1) añadir un disolvente de extracción a la mezcla compuesta por corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana, seguido de extracción;
- 2) filtrar el extracto de la etapa 1); y
- 3) concentrar el filtrado obtenido en la etapa 2) a presión reducida, seguido de secado del mismo.

En el procedimiento anterior, la corteza de raíz de peonía, la raíz de angélica china y la raíz de hierba gitana de la etapa 1) se compran o cultivan.

En el procedimiento anterior, el procedimiento para la extracción del extracto es cualquiera de los procedimientos convencionales, tales como filtración, extracción con agua caliente, enflorado, extracción por reflujo y extracción ultrasónica.

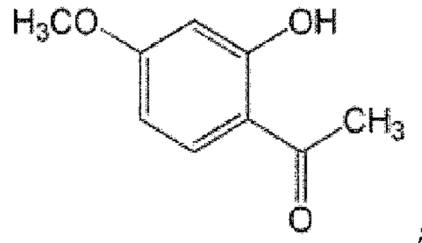
En este procedimiento, la concentración a presión reducida en la etapa 3) se realiza preferentemente usando un concentrador al vacío o un evaporador rotatorio al vacío, pero sin limitarse siempre a los mismos. El secado en el presente documento se realiza preferentemente mediante secado a presión reducida, secado al vacío, secado por ebullición, secado por pulverización o liofilización, pero sin limitarse siempre a los mismos.

Dicha fracción se prepara preferentemente a partir del extracto añadiendo un disolvente orgánico. El disolvente orgánico en el presente documento es preferentemente uno o más disolventes seleccionados entre el grupo que consiste en hexano, cloroformo, acetato de etilo y butanol, y más preferentemente butanol, pero sin limitarse siempre a los mismos.

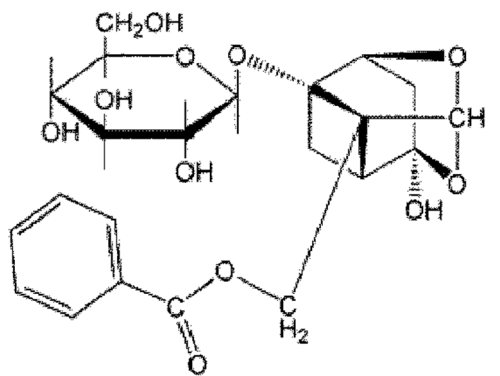
Dicho extracto contiene preferentemente uno o más compuestos seleccionados entre el grupo que consiste en paeonol (2'-hidroxi-4'-metoxiacetofenona) representado por la fórmula 1, paeoniflorina representada por la fórmula 2, paeoniflorigenona (benzoato de [(2s,3as,5s,7ar,8s)-3a-hidroxi-7a-metil-6-oxohexahidro-2,5-metano-1,3-benzodioxol-8-il]metilo) representada por la fórmula 3, imperatorina (9-[(3-metil-2-buten-1-il)oxi]-7h-furo[3,2-g] [1] benzopirano-7-oná) representada por la fórmula 4, saikosaponina A ((3beta,4alfa,16beta)-13,28-epoxi-16,23-dihidroxiolean-11-en-3-il-6-desoxi-3-O-beta-D-glucopiranosil-beta-D-galactopiranosido) representada por la fórmula 5, saikosaponina B2 ((3b,4a,16a)-16,23,28-trihidroxiolean-11,13(18)-dien-3-il-6-desoxi-3-O-beta-D-glucopiranosil-beta-D-galactopiranosido) representada por la fórmula 6, saikosaponina B4 ((3beta,11alpha,16alpha)-16,23,28-trihidroxi-11-metoxiolean-12-en-3-il-6-desoxi-3-O-beta-D-glucopiranosil-beta-D-galactopiranosido) representada por la fórmula 7 y saikosaponina D ((3b,4a,16a)-13,28-epoxi-16,23-dihidroxiolean-11-en-3-il 6-desoxi-3-O-beta-D-glucopiranosil beta-D-

galactopiranosido) representada por la fórmula 8, pero sin limitarse siempre a los mismos:

[Fórmula 1]

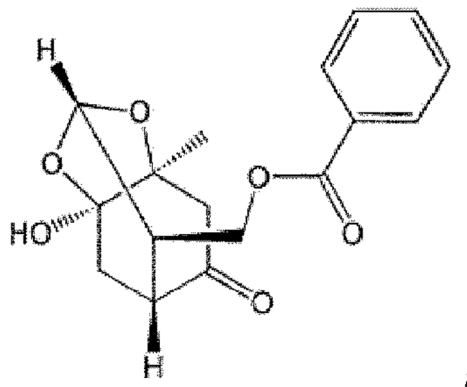


[Fórmula 2]

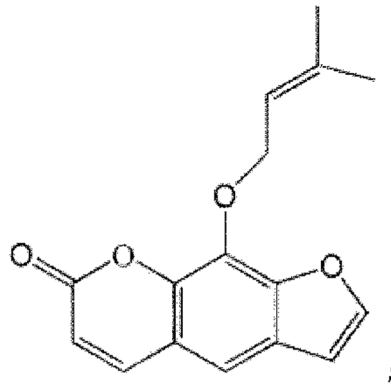


5

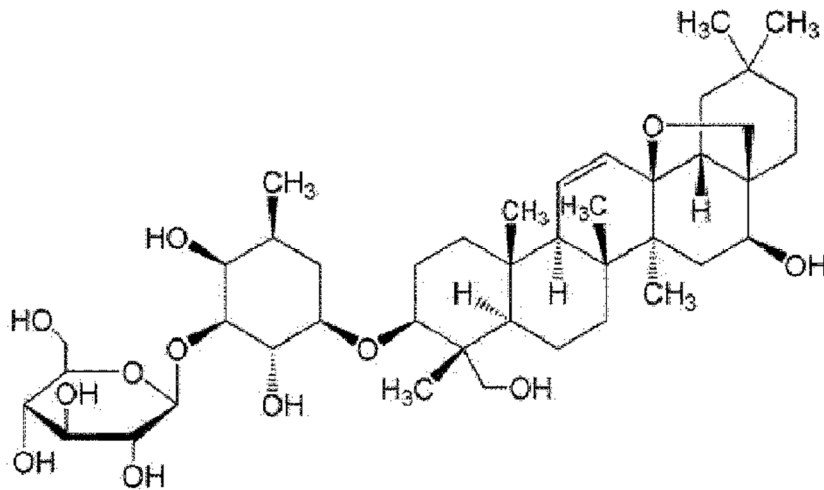
[Fórmula 3]



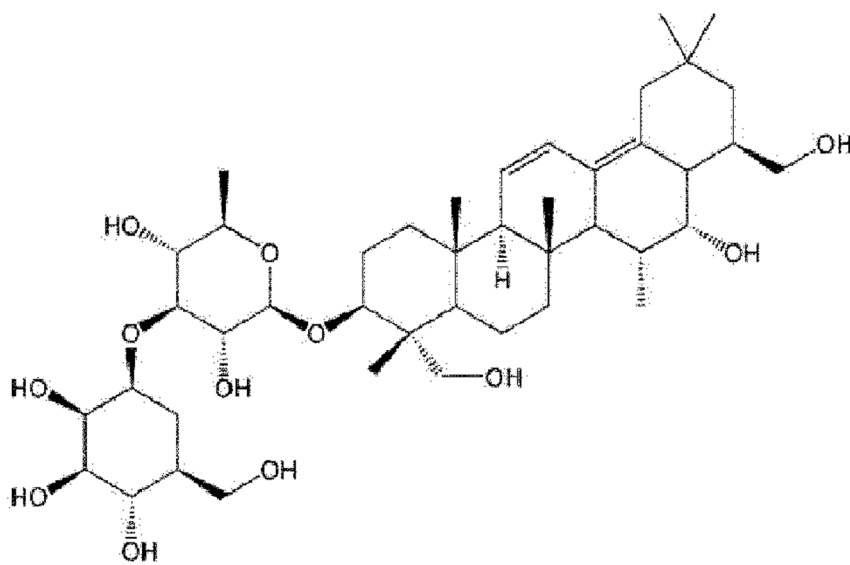
[Fórmula 4]



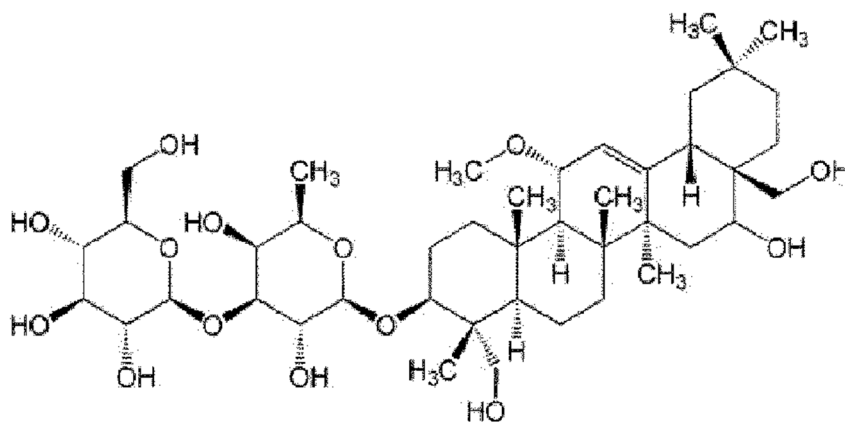
[Fórmula 5]



[Fórmula 6]

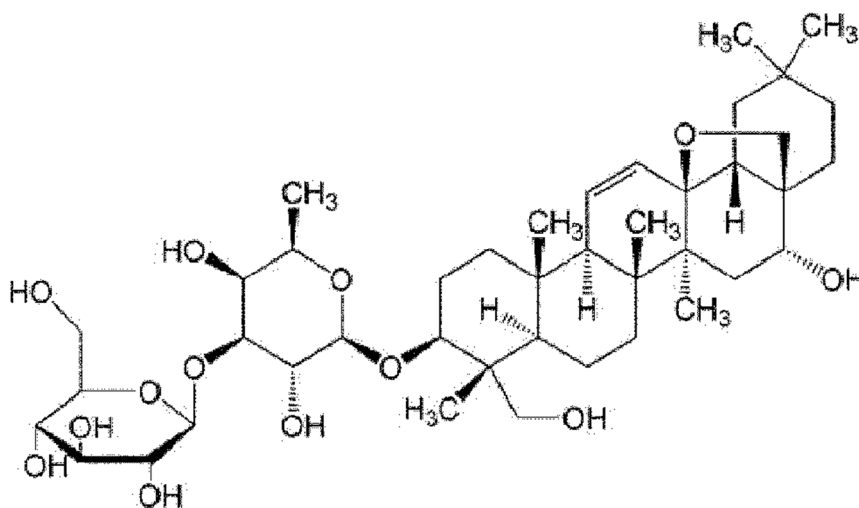


[Fórmula 7]



y

[Fórmula 8]



5 El extracto anterior inhibe preferentemente el daño funcional a las mitocondrias, el estrés del retículo endoplasmático o la respuesta inflamatoria, pero sin limitarse siempre a los mismos.

El trastorno neurológico degenerativo en el presente documento se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en demencia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad del Alzheimer, apoplejía, enfermedad de Lou Gehrig (esclerosis lateral amiotrófica) y lesión de la médula espinal, pero sin limitarse siempre a los mismos.

10

En un aspecto de la presente divulgación, los inventores de la presente invención investigaron la recuperación de células neuronales con daño funcional inducido para confirmar el efecto del extracto individual de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china o raíz de hierba gitana.

15

Como resultado, se confirmó que el extracto individual de corteza de raíz de peonía tenía el efecto de recuperación sobre el daño funcional a las mitocondrias (véase las tablas 2 ~ 7), mientras que el extracto individual de raíz angélica china tenía el efecto de recuperación sobre el estrés del retículo endoplasmático (véase las tablas 8 ~ 13). También se confirmó que el extracto individual de raíz de hierba gitana tenía el efecto de recuperación de la inflamación (véase las tablas 14 ~ 20).

20

El extracto de la mezcla compuesta por al menos dos de esos materiales seleccionados del grupo que consiste en corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con la presente divulgación demostró el efecto de recuperación del nivel de ATP y suprimió la generación de especies reactivas de oxígeno en el modelo celular de enfermedad de Parkinson. En particular, el extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana demostró el importante efecto de recuperación sobre el daño funcional a las mitocondrias (véase las tablas 21 ~ 24).

25

Los inventores de la presente invención también investigaron el efecto de recuperación del extracto de la mezcla de



corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la función celular en el modelo celular de enfermedad de Parkinson según la proporción de mezcla. Como resultado, cuando esos materiales de hierbas se mezclaron en una proporción de 1:1:1 (p:p:p), el efecto de recuperación de la función celular fue más eficiente (véase las tablas 24 ~ 26). Los inventores también investigaron el efecto de recuperación del extracto en etanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la función celular en el modelo celular de enfermedad de Parkinson de acuerdo con la concentración de etanol. Como resultado, cuando se trató el extracto de la mezcla extraído usando etanol al 90 %, el efecto de recuperación de la función celular combinado aumentó de manera más significativa (véase las tablas 28 ~ 30). El extracto en etanol podría aumentar el efecto de recuperación de la manera más significativa, en comparación con el extracto en agua, el extracto en metanol y el extracto en butanol (véase las tablas 31 a 33).

Para confirmar el efecto del extracto mixto en etanol al 90 % preparado a partir de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en una proporción de 1:1:1 (p:p:p), se investigó el efecto de recuperación en la línea celular neuronal inducida con daño de la función celular. Como resultado, se confirmó que el extracto de la mezcla exhibió el efecto de recuperación sobre el daño funcional de las mitocondrias, el estrés del retículo endoplasmático y la inflamación (véase las tablas 34 ~ 38).

Además, los modelos animales de enfermedad de Parkinson construidos usando 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), 6-hidroxidopamina (6-OHDA), rotenona y (lipopolisacárido) LPS se usaron con el fin de confirmar el efecto terapéutico del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la enfermedad de Parkinson *in vivo*. El extracto de la mezcla se administró al modelo en ratón de enfermedad de Parkinson construido mediante el tratamiento de MPTP, seguido de un ensayo de comportamiento. Como resultado, se mejoró la coordinación motora en el modelo de enfermedad de Parkinson, en comparación con el modelo animal no tratado con el extracto de la mezcla de la invención. El extracto de la mezcla de la invención también confirmó que tiene un efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas y un efecto de recuperación sobre el daño del sistema de transducción de señales en el estriado (ST), la sustancia negra (SN) y el cerebelo (véase las tablas 39 ~ 47). También se realizó el ensayo de comportamiento con el modelo en ratón de enfermedad de Parkinson construido mediante el tratamiento de 6-OHDA. Como resultado, se confirmó que el extracto de la mezcla de la invención tiene un efecto de mejora en la coordinación motora y un efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas en el cuerpo estriado y la sustancia negra (véase las tablas 48 ~ 52). También se realizó el ensayo de comportamiento con el modelo en ratón de enfermedad de Parkinson construido mediante el tratamiento de rotenona. Como resultado, la función motora suprimida por la rotenona mejoró y la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína-oligómero, el principal factor patógeno de la enfermedad de Parkinson, se redujo en la sustancia negra (véase las tablas 53 ~ 54). Mientras tanto, en el modelo en ratón de neuroinflamación construido mediante la administración de LPS, la activación de la microglía y los astrocitos inducida en la sustancia negra y el hipocampo fue inhibida por el extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana, lo que sugiere que el efecto antiinflamatorio se mostró allí (véase las tablas 55 ~ 58).

El extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención exhibe un efecto de recuperación sobre el daño de la función mitocondrial, un efecto de alivio sobre el estrés del retículo endoplasmático y también muestra simultáneamente un efecto inhibitorio sobre la respuesta inflamatoria, que son notoriamente mejorados en comparación con los exhibidos en un extracto individual *in vitro*, y el extracto de la mezcla exhibe significativamente un efecto de mejora en la coordinación motora y un efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas en un modelo animal de enfermedad de Parkinson, y por lo tanto el extracto de la mezcla de la presente invención o una fracción del mismo puede ser útil como principio activo de una composición farmacéutica para tratar y prevenir trastornos neurológicos degenerativos.

La composición de la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral y se puede usar en formas generales de formulación farmacéutica. Es decir, la composición de la presente invención se puede preparar para administración oral o parenteral mezclando con diluyentes o excipientes de uso general, tales como cargas, expansores, aglutinantes, agentes humectantes, agentes disgregantes y tensioactivos.

Las formulaciones sólidas para administración oral son comprimidos, píldoras, polvos, gránulos y cápsulas. Estas formulaciones sólidas se preparan mezclando dicha betaína con uno o más excipientes adecuados, tales como almidón, carbonato de calcio, sacarosa o lactosa, gelatina, etc. Excepto los excipientes simples, se pueden usar lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, etc. Las formulaciones líquidas para administraciones orales son suspensiones, soluciones, emulsiones y jarabes, y las formulaciones mencionadas anteriormente pueden contener diversos excipientes, tales como agentes humectantes, edulcorantes, aromáticos y conservantes, además de diluyentes simples de uso general, tales como agua y parafina líquida.

Las formulaciones para administración parenteral son soluciones acuosas esterilizadas, excipientes insolubles en agua, suspensiones, emulsiones, preparaciones liofilizadas y supositorios. Los excipientes y suspensiones insolubles en agua pueden contener, además del compuesto o compuestos activos, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal como aceite de oliva, éster inyectable como etilolato, etc. Los supositorios pueden contener, además del compuesto o compuestos activos, witepsol, macrogol, tween 61, manteca de cacao, manteca de laurina, glicerol, gelatina, etc.

La composición de la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral y la administración parenteral

se ejemplifica preferentemente mediante aplicación externa en la piel, inyección intraperitoneal, inyección intrarrectal, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intrauterina e inyección intracerebroventricular. Entre estas, la aplicación externa en la piel es más preferida.

5 La composición de la presente invención se administra preferentemente a una dosis farmacéuticamente eficaz. La expresión "dosis farmacéuticamente eficaz" en el presente documento indica la cantidad suficiente para tratar la enfermedad con una concentración aplicable, razonable o de riesgo. La dosis puede determinarse considerando muchos factores tales como el tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad, la actividad del fármaco, la sensibilidad al fármaco, la frecuencia y la vía de administración, la excreción, el plazo del tratamiento, el fármaco de  
10 cotratamiento y otros factores considerados, según corresponda en el campo medicinal. La composición de la presente invención se puede administrar sola o junto con otros fármacos. Si se necesita un cotratamiento, la administración se podría realizar de forma gradual o simultánea. La composición se puede administrar individualmente o de forma múltiple. Es importante tener en cuenta todos los factores anteriores y administrar la cantidad en la que se puede obtener el máximo efecto en la cantidad mínima sin efectos secundarios, lo que puede ser determinado fácilmente por los expertos en la materia.

15 La dosis eficaz del compuesto de la presente invención puede determinarse de acuerdo con el peso, la edad, el sexo, el estado de salud, la dieta, la frecuencia de administración, el procedimiento de administración, la excreción y la gravedad de una enfermedad. La dosis es de 0,01 ~ 1000 mg/kg por día, preferentemente de 30 ~ 500 mg/kg por día, y más preferentemente de 50 ~ 300 mg/kg por día, y la frecuencia de administración es de 1 ~ 6 veces por día. Sin embargo, la dosis eficaz puede aumentarse o disminuirse de acuerdo con la vía de administración, la gravedad de la  
20 obesidad, el sexo, el peso corporal y la edad del paciente, etc., de modo que la dosis eficaz anterior no pueda limitar la presente invención en ningún aspecto.

La composición de la presente invención se puede administrar sola o tratarse junto con operación quirúrgica, terapia hormonal, quimioterapia y reguladores biológicos.

25 La presente invención también proporciona un alimento funcional saludable para mejorar o prevenir trastornos neurológicos degenerativos que comprende un extracto de una mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana como principio activo.

La presente invención también proporciona un alimento funcional saludable para mejorar o prevenir trastornos neurológicos degenerativos que comprende una fracción de disolvente orgánico del extracto de la mezcla corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana como principio activo.

30 Se prefiere mezclar corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana a la proporción en peso de 1:0,2 ~ 5:0,2 ~ 5 (p:p:p). Más preferentemente corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana se mezclan a la proporción de 1:0,5 ~ 2:0,5 ~ 2 (p:p:p), y de la manera más preferente a la proporción de 1:1:1 (p:p:p), pero sin limitarse siempre a los mismos.

35 De acuerdo con la presente divulgación, dos materiales seleccionados entre el grupo que consiste en corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana se mezclan preferentemente a la proporción en peso de 1:0,2 ~ 5 (p:p), más preferentemente a la proporción de 1:0,5 ~ 2 (p:p), y de la manera más preferente a la proporción de 1:1 (p:p), pero sin limitarse siempre a los mismos.

El extracto de la mezcla anterior se extrae preferentemente usando agua, alcohol inferior de C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> o una mezcla de los mismos, como disolvente, y en este momento el alcohol inferior es preferentemente etanol, metanol o butanol.

40 El extracto de la mezcla se extrae preferentemente de la mezcla compuesta por corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana.

45 Dicho extracto de mezcla contiene preferentemente uno o más compuestos seleccionados entre el grupo que consiste en paeonol representado por la fórmula 1, paeoniflorina representada por la fórmula 2, paeoniflorigenona representada por la fórmula 3, imperatorina representada por la fórmula 4, saikosaponina A representada por la fórmula 5, saikosaponina B2 representada por la fórmula 6, saikosaponina B4 representada por la fórmula 7, y saikosaponina D representada por la fórmula 8, pero sin limitarse siempre a los mismos.

El extracto de la mezcla anterior inhibe preferentemente el daño funcional a las mitocondrias, el estrés del retículo endoplasmático y la respuesta inflamatoria, pero sin limitarse siempre a los mismos.

50 El trastorno neurológico degenerativo en el presente documento se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en demencia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad del Alzheimer, apoplejía, enfermedad de Lou Gehrig (esclerosis lateral amiotrófica) y lesión de la médula espinal, y la enfermedad de Parkinson es más preferida, pero sin limitarse siempre a los mismos.

55 El extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención exhibe un efecto de recuperación sobre el daño de la función mitocondrial, un efecto de alivio sobre el estrés del retículo endoplasmático y también muestra simultáneamente un efecto inhibitorio sobre la respuesta inflamatoria,

que son notoriamente mejorados en comparación con los exhibidos en un extracto individual *in vitro*, y el extracto de la mezcla exhibe significativamente un efecto de mejora en la coordinación motora y un efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas en un modelo animal de enfermedad de Parkinson, y por lo tanto el extracto de la mezcla de la presente invención o una fracción del mismo puede ser útil como principio activo de un alimento funcional saludable para mejorar y prevenir trastornos neurológicos degenerativos.

5 La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar o prevenir trastornos neurológicos degenerativos que comprende la etapa de administrar una dosis farmacéuticamente eficaz de un extracto de una mezcla de corteza de raíz de peonía (*Moutan Radicis Cortex*), raíz de angélica china (*Angelicae Dahuricae Radix*) y raíz de hierba gitana (*Bupleuri Radix*) a un sujeto.

10 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un extracto de una mezcla de corteza de raíz de peonía (*Moutan Radicis Cortex*), raíz de angélica china (*Angelicae Dahuricae Radix*) y raíz de hierba gitana (*Bupleuri Radix*), para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos neurológicos degenerativos.

15 La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar o prevenir trastornos neurológicos degenerativos que comprende la etapa de administrar una dosis farmacéuticamente eficaz de una fracción de disolvente orgánico del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana a un sujeto.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una fracción de disolvente orgánico del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana, para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos neurológicos degenerativos.

20 El extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención exhibe un efecto de recuperación sobre el daño de la función mitocondrial, un efecto de alivio sobre el estrés del retículo endoplasmático y también muestra simultáneamente un efecto inhibitorio sobre la respuesta inflamatoria, que están notablemente mejorados en comparación con los que se muestran en un extracto individual *in vitro*, y el extracto de la mezcla exhibe significativamente un efecto de mejora en la coordinación motora, un efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas y un efecto antiinflamatorio en un modelo animal de enfermedad de Parkinson, y de este modo, el extracto de la mezcla de la presente invención o una fracción del mismo puede ser útil como principio activo de una composición farmacéutica para tratar y prevenir trastornos neurológicos degenerativos.

Las realizaciones prácticas y actualmente preferidas de la presente invención son ilustrativas como se muestra en los siguientes ejemplos.

30 **Ejemplo 1 (no de acuerdo con la invención): Preparación de un extracto individual de cada uno de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana**

<1-1> Preparación de extracto en etanol de corteza de raíz de peonía

35 Se añadió etanol al 90 % a la corteza de raíz de peonía (*Moutan Radicis Cortex*; Jeungdo Herb Medicine Co., Corea), seguido de extracción a temperatura ambiente durante 110 minutos. Se preparó un extracto en etanol filtrando el extracto. El extracto obtenido se liofilizó y se almacenó. En el momento de su uso, el extracto se disolvió en un tampón. Como componente índice del extracto, se usó paeonol para confirmar la pureza.

<1-2> Preparación de extracto en etanol de raíz de angélica china

40 Se añadió etanol al 90 % a la raíz de angélica china (*Angelicae Dahuricae Radix*; Jeungdo Herb Medicine Co., Corea). Se preparó un extracto en etanol de raíz de angélica china de la misma manera que se describe en el ejemplo <1-1>. Como componente índice del extracto de raíz de angélica china, se usó imperatorina para confirmar la pureza.

<1-3> Preparación de extracto en etanol de raíz de hierba gitana

Se añadió etanol al 90 % a la raíz de hierba gitana (*Bupleuri Radix*; Jeungdo Herb Medicine Co., Corea). Se preparó un extracto en etanol de raíz de hierba gitana de la misma manera que se describe en el ejemplo <1-1>. Como componente índice del extracto de raíz de hierba gitana, se usó saikosaponina A para confirmar la pureza.

45 **Ejemplo 2 (no de acuerdo con la invención): Preparación de extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china**

50 Se mezclaron corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china en una proporción de 1:5, 1:1 o 1:0,2 (p:p), a las que se añadió etanol al 90 %, seguido de extracción a temperatura ambiente durante 110 minutos. Un extracto en etanol mixto de corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china se preparó filtrando el extracto. El extracto en etanol mixto obtenido se liofilizó y se almacenó. En el momento de su uso, el extracto se disolvió en agua o un tampón. Como componentes índice del extracto de la mezcla, se usaron paeonol e imperatorina para confirmar la pureza.

Ejemplo 3 (no de acuerdo con la invención): Preparación de extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía y raíz de hierba gitana

5 Se mezclaron corteza de raíz de peonía y raíz de hierba gitana en una proporción de 1:5, 1:1 o 1:0,2 (p:p), a las que se añadió etanol al 90 %, seguido de extracción a temperatura ambiente durante 110 minutos. Un extracto en etanol mixto de corteza de raíz de peonía y raíz de hierba gitana se preparó filtrando el extracto. El extracto en etanol mixto obtenido se liofilizó y se almacenó. En el momento de su uso, el extracto se disolvió en un tampón. Como componentes índice del extracto de la mezcla, se usaron paeonol y saikosaponina A para confirmar la pureza.

Ejemplo 4 (no de acuerdo con la invención): Preparación de extracto de mezcla de raíz de angélica china y raíz de hierba gitana

10 Se mezclaron raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en una proporción de 1:5, 1:1 o 1:0,2 (p:p), a las que se añadió etanol al 90 %, seguido de extracción a temperatura ambiente durante 110 minutos. Un extracto en etanol mixto de raíz de angélica china y raíz de hierba gitana se preparó filtrando el extracto. El extracto en etanol mixto obtenido se liofilizó y se almacenó. En el momento de su uso, el extracto se disolvió en un tampón. Como componentes índice del extracto de la mezcla, se usaron imperatorina y saikosaponina A para confirmar la pureza.

15 Ejemplo 5: Preparación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana <5-1> Preparación de un extracto en etanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana

20 Se mezclaron corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana a la proporción mostrada en la tabla 1 a continuación, a las que se añadió etanol al 10, 30, 50, 70 o 90 %, seguido de extracción a temperatura ambiente durante 110 minutos. Un extracto en etanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana se preparó filtrando el extracto. El extracto en etanol mixto obtenido se liofilizó y se almacenó. En el momento de su uso, el extracto se disolvió en un tampón. Como componentes índice del extracto de la mezcla, se usaron paeonol, saikosaponina A e imperatorina para confirmar la pureza.

[Tabla 1]

Proporción de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana			
N.º	Proporción de mezcla (% p:p:p)		
	Corteza de raíz de peonía	Raíz de angélica china	Raíz de hierba gitana
1	1	2	1
2	1	1	2
3	1	2	2
4	1	0,5	1
5	1	1	0,5
6	1	0,5	0,5
7	1	3	1
8	1	1	3
9	1	3	3
10	1	0,33	1
11	1	1	0,33
12	1	0,33	0,33
13	1	4	1
14	1	1	4
15	1	4	4
16	1	0,25	1
17	1	1	0,25

(continuación)

Proporción de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana			
N.º	Proporción de mezcla (% p:p:p)		
	Corteza de raíz de peonía	Raíz de angélica china	Raíz de hierba gitana
18	1	0,25	0,25
19	1	5	1
20	1	1	5
21	1	5	5
22	1	0,2	1
23	1	1	0,2
24	1	0,2	0,2
25	1	1	1

<5-2> Preparación de un extracto en agua mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana

5 Se mezclaron corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana a la proporción de 1:1:1 (p:p:p), a las que se añadió agua. Un extracto en agua mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana se preparó de la misma manera que se describe en el ejemplo <5-1>.

<5-3> Preparación de un extracto en metanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana

10 Se mezclaron corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana a la proporción de 1:1:1 (p:p:p), a las que se añadió metanol al 90 %. Un extracto en metanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana se preparó de la misma manera que se describe en el ejemplo <5-1>.

<5-4> Preparación de un extracto en butanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana

15 Se mezclaron corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana a la proporción de 1:1:1 (p:p:p), a las que se añadió butanol al 90 %. Un extracto en butanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana se preparó de la misma manera que se describe en el ejemplo <5-1>.

Ejemplo experimental 1 (no de acuerdo con la invención): Evaluación de la eficacia intracelular del extracto de corteza de raíz de peonía y su componente activo

<1-1> Efecto del extracto de corteza de raíz de peonía y su componente activo sobre la tasa de supervivencia celular

20 Para evaluar la eficacia intracelular del extracto de corteza de raíz de peonía de la presente invención y su componente activo, se investigó la citotoxicidad en células de neuroblastoma humano.

25 Particularmente, SH-SY5Y, la línea celular de neuroblastoma humano, se inoculó en DMEM/F12 (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco y F12 de Ham; Gibco, EE. UU.) complementado con FBS al 10 %, seguido de cultivo a una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %/ aire al (O<sub>2</sub>) 95 %. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 2,5X10<sup>4</sup> células/pocillo. Las células se trataron con el extracto de corteza de raíz de peonía preparado en el ejemplo <1-1> o su componente activo, paeonol, paeoniflorina o paeoniflorigenona a la concentración de 1,0 µg/ml durante 4 horas. Las células se recogieron y la tasa de supervivencia celular se midió usando calceína. La tasa de supervivencia de las células que aumentó o disminuyó en comparación con la de las células de control normales no tratadas con el extracto o su componente activo anterior y en su lugar tratadas con DMSO se calculó y se presentó como porcentaje (%).

30 Como resultado, como se muestra en la Tabla 2 posterior, el extracto de corteza de raíz de peonía y su componente activo no mostraron citotoxicidad en células normales (tabla 2).

[Tabla 2]

Efecto del extracto de corteza de raíz de peonía y su componente activo sobre la tasa de supervivencia celular			
Sustancia de tratamiento		Conc. (µg/ml)	Tasa de supervivencia celular (% del control)
Grupo de control normal		-	100,0 ± 7,35
Extracto de corteza de raíz de peonía y principio activo	Extracto en etanol al 90 %	1	105,4 ± 6,83
	Paeonol	1	102,2 ± 9,10
	paeoniflorina	1	97,9 ± 7,34
	paeoniflorigenona	1	98,9 ± 8,10

<1-2> Efecto inhibitor del extracto de corteza de raíz de peonía y su componente activo sobre la muerte celular inducida por daño mitocondrial

5 Para investigar el efecto del extracto de corteza de raíz de peonía y su principio activo sobre la recuperación del daño funcional mitocondrial, se realizó un ensayo con MTT para confirmar el efecto de recuperación sobre el daño del complejo 1 mitocondrial en las células.

10 Particularmente, SH-SY5Y, la línea celular de neuroblastoma humano, se inoculó en DMEM/F12 (1:1, Medio de Eagle Modificado por Dulbecco y F12 de Ham; Gibco, EE. UU.) complementado con FBS al 10 %, seguido de cultivo a una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %/ aire al (O<sub>2</sub>) 95 %. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 1X10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células se trataron con el extracto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía preparado en el ejemplo <1-1> o su componente activo, paeonol, paeoniflorina o paeoniflorigenona a la concentración de 1,0 µg/ml, seguido de cultivo durante 4 horas. Las células se trataron después con 50 µg/ml de atrazina (2-cloro-4- (etilamina)-6-(isopropilamina)-s-triazina, ATZ), seguido de cultivo durante 24 horas para inducir el mal funcionamiento de las mitocondrias. Las células con mitocondrias que funcionaron mal se trataron con 0,2 mg/ml de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio, MTT; Sigma, EE. UU.), seguido de cultivo durante 15 4 horas. Después, el precipitado de formazano-MTT formado por células sobrevivientes se disolvió en 100 µl de HCl/isopropanol 0,04 N. La DO<sub>540</sub> se midió con un lector de microplacas de ELISA (Molecular Devices, EE. UU.). Se confirmó que el daño del complejo 1 mitocondrial observó cómo aumentaba o disminuía el nivel de daño, en comparación con el grupo de control normal tratado con DMSO sin el extracto o su componente activo. Mientras tanto, el grupo de control negativo se trató con 50 µg/ml de atrazina sola para inducir daño mitocondrial y no se trató con el extracto o su componente activo. Después, el ensayo de MTT se realizó de la misma manera que se describió anteriormente.

20 Como resultado, como se muestra en la Tabla 3 posterior, el daño mitocondrial inducido por atrazina se recuperó al nivel normal mediante el tratamiento del extracto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, paeonol, paeoniflorina o paeoniflorigenona (tabla 3).

[Tabla 3]

Efecto de recuperación del extracto de corteza de raíz de peonía y su componente activo sobre el daño del complejo 1 mitocondrial			
Tratamiento		Inductor (atrazina, µg/ml)	MTT (% del control)
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	100,0 ± 2,79
Control negativo	-	50	76,7 ± 7,35
Extracto de corteza de raíz de peonía	1	50	94,3 ± 5,55
Paeonol	1	50	101,8 ± 7,21
paeoniflorina	1	50	96,4 ± 7,44
paeoniflorigenona	1	50	95,5 ± 6,09

<1-3> Efecto de recuperación del extracto de corteza de raíz de peonía y su componente activo sobre la pérdida de ATP, que resultó del daño de las mitocondrias

Para investigar el efecto del extracto de corteza de raíz de peonía y su principio activo sobre la recuperación del daño

funcional mitocondrial, se realizó un ensayo con ATP para confirmar el efecto de recuperación sobre la pérdida de ATP en las células.

- 5 Particularmente, se cultivaron células SH-SY5Y de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-2>, que se trataron con 50 µg/ml de atrazina para inducir el mal funcionamiento de las mitocondrias. Después, se mezclaron 100 µl del lisado celular obtenido a partir de las células con las mitocondrias que funcionaban mal con 100 µl de luciferina-luciferasa utilizando un kit de ensayo de células somáticas bioluminiscentes con ATP (Sigma, EE. UU.), seguido de cultivo a 20 °C durante 10 minutos. Se obtuvo el sobrenadante. La señal de fluorescencia se midió usando el luminómetro LB 9501 Lumat (Berthold, Alemania). La fluorescencia del pocillo de control que contenía el medio libre de células se usó como fondo. Los valores medidos se calcularon restando el fondo y la cantidad de ATP se normalizó a la concentración de proteína. El control normal no se trató con el extracto de la invención o el componente activo del mismo, sino que, en su lugar, se trató con DMSO solo. Todos los resultados se presentaron como % respecto al control normal para presentar el nivel de ATP intracelular. El control negativo se trató con 50 µg/ml de atrazina sola para inducir daño mitocondrial y no se trató con el extracto o el componente activo del mismo. El nivel de ATP intracelular se midió de la misma manera que se describió anteriormente.
- 10
- 15 Como resultado, como se muestra en la Tabla 4 posterior, el daño mitocondrial inducido por atrazina se recuperó al nivel normal mediante el tratamiento del extracto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, paeonol, paeoniflorina o paeoniflorigenona (tabla 4).

[Tabla 4]

Efecto de recuperación del extracto de corteza de raíz de peonía y su componente activo sobre la pérdida de ATP intracelular			
Tratamiento		Inductor (atrazina, µg/ml)	Contenido de ATP intracelular (% del control)
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	100,0 ± 6,45
Control negativo	-	50	68,7 ± 8,09
Extracto de corteza de raíz de peonía	1	50	91,2 ± 4,08
Paeonol	1	50	101,9 ± 7,42
paeoniflorina	1	50	94,3 ± 6,44
paeoniflorigenona	1	50	89,1 ± 7,97

- 20 <1-4> Expresión del gen implicado en enfermedad de Parkinson o las mitocondrias de acuerdo con el extracto de corteza de raíz de peonía y su componente activo

Para investigar el efecto del extracto de corteza de raíz de peonía de la presente invención y su componente activo sobre la recuperación de la función mitocondrial dañada, los niveles de expresión del gen de la subunidad III de la citocromo c oxidasa (COX III) sintetizado por el gen mitocondrial y Park7 (DJ-1), uno de los genes causantes de la enfermedad de Parkinson familiar, se midieron mediante PCR en tiempo real (RT-PCR).

- 25 Particularmente, se cultivaron células SH-SY5Y de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-2> y se indujo un mal funcionamiento mitocondrial. Después, las células con las mitocondrias que funcionaron mal se suspendieron en TRIzol (Invitrogen, EE. UU.) y se extrajo el ARN total de las mismas de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADNc total se sintetizó con 1 µg del ARN extraído. La PCR se realizó con el sistema GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystem, EE. UU.) en las condiciones óptimas requeridas mediante el uso del ADNc sintetizado como modelo en presencia de los cebadores directos e inversos enumerados en la tabla 5 a continuación, lo que lleva a la
- 30 amplificación de los genes *COX III* y *Park7* (DJ-1). Los productos de PCR amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %. La concentración relativa se midió usando un densitómetro de imagen (software Alpha Ease FC; Alpha Innotech, EE. UU.) bajo UV. El nivel de ARNm se estandarizó en comparación con el nivel de ARNr 18S. El control normal no se trató con el extracto de la invención o el componente activo del mismo, sino que, en su lugar, se trató con DMSO solo. El control negativo se trató con 50 µg/ml de atrazina sola para inducir daño mitocondrial y no se trató con el extracto o el componente activo del mismo. El nivel de expresión génica se investigó de la misma manera que se describió anteriormente.
- 35

[Tabla 5]

Secuencias de los cebadores usados en la presente invención					
Nombre del gen	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO:	Longitud del producto (pb)	Temp. (°C)
COX III	COX III_F	5' - CAATGATGGCGCGATGTAAC - 3'	SEQ ID NO: 1	270	60
	COX III_R	5' - GGTGATTGATACTCCTGATG - 3'	SEQ ID NO: : 2		
		3'			
PARK7	PARK7_F	5' - CGAGCTGGGATTAAGGTCAC - 3'	SEQ ID NO: : 3	267	60
	PARK7_R	5' - TTCATGAGCCAACAGAGCAG - 3'	SEQ ID NO: 4		
GRP78	GRP78_F	5' - GAGATCATCGCCAACGATCAG - 3'	SEQ ID NO: : 5	188	55
	GRP78_R	5' - ACTTGATGTCCTGCTGCACAG - 3'	SEQ ID NO: 6		
XBP1P	XBP1p_F	5' - GGTCTGCTGAGTCCGCAGCAGG -3'	SEQ ID NO: : 7	335	60
	XBP1p_R	5' - GGGCTTGGTATATATGTGG -3'	SEQ ID NO: 8		
iNOS	iNOS_F	5' - CCTGGAGGTTCTGGATGAGA - 3'	SEQ ID NO: : 9	320	60
	iNOS_R	5' - GTAGTAGCGGGGCTTCAAGA - 3'	SEQ ID NO: 10		



(continuación)

Secuencias de los cebadores usados en la presente invención					
Nombre del gen	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO:	Longitud del producto (pb)	Temp. (°C)
IL-6	IL-6_F	5' - CTGGAGTACCATAGCTACCTGG AG-3'	SEQ ID NO: 11	190	60
	IL-6_R	5' - GTCCTTAGCCACTCCTTCTGTG -3'	SEQ ID NO: : 12		
p65/RELA	p65/R ELA_F	5' - GACCAACAATAACCCCTTTCAC -3'	SEQ ID NO: 13	700	60
	p65/R ELA_R	5' - GTTTGAGATCTGCCCTGATGG- 3'	SEQ ID NO: 14		
18srRNA	18s rRNA_F	5' - GAGCGAAAGCATTGCCAAG- 3'	SEQ ID NO: : 15	101	60
	18s rRNA_R	5' - GGCATCGTTTATGGTCGGAA- 3'	SEQ ID NO: : 16		

Como resultado, como se muestra en la tabla 6 y la tabla 7, las expresiones reducidas de *COX III* sintetizado por el gen mitocondrial y *Park7 (DJ-1)*, uno de los genes causantes de la enfermedad de Parkinson familiar, se recuperaron ambas al nivel normal (tablas 6 y 7).

[Tabla 6]

Expresión de <i>COX III</i> de acuerdo con el extracto de corteza de raíz de peonía y su componente activo			
Sustancia de tratamiento		Conc. (µg/ml)	<i>COX III</i> /ARNr 18S
Control normal	-	-	1,00 ± 0,04
Extracto de corteza de raíz de peonía	-	1	0,93 ± 0,06
Paeonol	-	1	1,05 ± 0,03
paeoniflorina	-	1	1,11 ± 0,04
paeoniflorigenona	-	1	1,04 ± 0,05
Control negativo	atrazina	-	0,52 ± 0,08
Extracto de corteza de raíz de peonía	atrazina	1	0,91 ± 0,08
Paeonol	atrazina	1	1,07 ± 0,07
paeoniflorina	atrazina	1	0,92 ± 0,08
paeoniflorigenona	atrazina	1	0,86 ± 0,07

[Tabla 7]

Expresión de <i>Park7</i> (DJ-1) de acuerdo con el extracto de corteza de raíz de peonía y su componente activo			
Sustancia de tratamiento		Conc. (µg/ml)	<i>Park7</i> (DJ-1)/ARNr 18S
Control normal	-	-	1,00 ± 0,08
Extracto de corteza de raíz de peonía	-	1	0,98 ± 0,07
Paeonol	-	1	1,22 ± 0,08
paeoniflorina	-	1	1,05 ± 0,08
paeoniflorigenona	-	1	0,98 ± 0,08
Control negativo	atrazina	-	0,39 ± 0,02
Extracto de corteza de raíz de peonía	atrazina	1	1,30 ± 0,08
Paeonol	atrazina	1	0,95 ± 0,07
paeoniflorina	atrazina	1	2,03 ± 0,07
paeoniflorigenona	atrazina	1	0,45 ± 0,02

Ejemplo experimental 2 (no de acuerdo con la invención): Evaluación de la eficacia intracelular del extracto de raíz de angélica china y su componente activo

<2-1> Efecto del extracto de raíz de angélica china y su componente activo sobre la tasa de supervivencia celular

- 5 Para evaluar la eficacia intracelular del extracto de raíz de angélica china de la presente invención y su componente activo, se investigó la citotoxicidad en células de neuroblastoma humano.

Particularmente, se cultivaron células SH-SY5Y de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-1>. las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de  $2,5 \times 10^4$  células/pocillo. Las células se trataron con 1,0 µg/ml del extracto de raíz de angélica china preparado en el ejemplo <1-2> o 0,5 µg/ml o 1,0 µg/ml del componente activo del mismo, imperatorina, durante 4 horas. Las células se recogieron y la tasa de supervivencia celular se midió usando calceína. La tasa de supervivencia celular que aumentó o disminuyó en comparación con la del grupo de control normal no tratado con el extracto o su componente activo anterior y en su lugar tratado con DMSO se calculó y se presentó como porcentaje (%).

- 15 Como resultado, como se muestra en la tabla 8, el extracto de raíz de angélica china e imperatorina no causaron citotoxicidad en las células normales a una concentración de 0,5 mg/ml. Sin embargo, la imperatorina causó toxicidad a un nivel bajo a la concentración de 1 µg/ml (tabla 8).

[Tabla 8]

Tasa de supervivencia celular de acuerdo con el extracto de raíz de angélica china y su componente activo			
Tratamientos	sustancia	Conc. (µg/ml)	Tasa de supervivencia celular (% del control)
Control normal		-	100,00 ± 0,89
Extracto de raíz de angélica china y principio activo	Extracto en etanol al 90 %	1,0	99,50 ± 1,02
	Imperatorina	0,5	101,16 ± 0,59
	Imperatorina	1,0	79,16 ± 1,39

<2-2> Efecto inhibitor del extracto de raíz de angélica china y su componente activo sobre la muerte celular inducida por estrés del retículo endoplasmático

- 20 Para investigar si el extracto de raíz de angélica china de la invención y su componente activo podrían inducir la recuperación del estrés del retículo endoplasmático, se realizó un ensayo de MTT con las células que presentaban estrés del retículo endoplasmático inducido por el tratamiento de tunicamicina (Tuni) que se sabe induce estrés del retículo endoplasmático mediante la inhibición de la N-glucosilación o mediante el tratamiento de taspigargina (Thap) que se sabe induce estrés del retículo endoplasmático al destruir la homeostasis del calcio para confirmar la
- 25 recuperación del daño del complejo 1 mitocondrial en las células vivas.

Particularmente, se cultivaron células SH-SY5Y de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-2>. Las células se trataron con 1,0 µg/ml del extracto de raíz de angélica china preparado en el ejemplo <1-2> o 0,5 µg/ml o 1,0 µg/ml de imperatorina, el componente activo del mismo, seguido de cultivo durante 4 horas. Las células se trataron con 0,5 µg/ml de tapsigargina (Thap) o 1 µg/ml de tunicamicina (Tuni), seguido de cultivo durante 24 horas para inducir el estrés del retículo endoplasmático. Después, el ensayo de MTT se realizó de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-2>. En comparación con las células de control normales que no se trataron con el extracto o el componente activo del mismo, sino que se trataron con DMSO, se investigó el daño del complejo 1 mitocondrial en las células, ya sea incrementado o disminuido. El control negativo se trató con 0,5 µg/ml de tapsigargina o 1 µg/ml de tunicamicina para causar estrés del retículo endoplasmático pero no se trató con el extracto o el componente activo del mismo, seguido del ensayo de MTT de la misma manera que se describió anteriormente.

Como resultado, como se muestra en la tabla 9 y la tabla 10, el daño funcional de las mitocondrias y la muerte celular inducida por el estrés del retículo endoplasmático causado por tapsigargina o tunicamicina se recuperaron al nivel normal mediante el tratamiento del extracto en etanol al 90 % de raíz de angélica china e imperatorina (tablas 9 y 10).

[Tabla 9]

Efecto de recuperación del extracto de raíz de angélica china y su componente activo sobre el estrés del retículo endoplasmático mediado por daño al complejo 1 mitocondrial inducido por tapsigargina			
Tratamiento		Inductor (tapsigargina, µg/ml)	MTT (% del control)
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	100,00 ± 4,09
Control negativo	-	0,5	65,61 ± 1,37
Extracto de raíz de angélica china	1,0	0,5	82,45 ± 3,80
Imperatorina	0,5	0,5	86,23 ± 5,31

[Tabla 10]

Efecto de recuperación del extracto de raíz de angélica china y su componente activo sobre el estrés del retículo endoplasmático mediado por daño al complejo 1 mitocondrial inducido por tunicamicina			
Tratamiento		Inductor (tunicamicina, µg/ml)	MTT (% del control)
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	100,00 ± 5,73
Control negativo	-	1,0	69,63 ± 3,42
Extracto de raíz de angélica china	1,0	1,0	83,99 ± 2,01
Imperatorina	0,5	1,0	84,93 ± 3,68

<2-3> Efecto de recuperación del extracto de raíz de angélica china y el componente activo del mismo sobre la pérdida de ATP, que resultó del estrés del retículo endoplasmático

Para investigar el efecto del extracto de raíz de angélica china y su componente activo sobre la recuperación del estrés del retículo endoplasmático, se realizó un ensayo con ATP para confirmar el efecto de recuperación sobre la pérdida de ATP en las células.

Particularmente, se cultivaron células SH-SY5Y de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <2-2> y se indujo estrés del retículo endoplasmático. Después, el nivel de ATP intracelular se midió de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-3>. El control normal no se trató con el extracto de la invención o el componente activo del mismo, sino que se trató con DMSO solo. Todos los resultados se presentaron como % respecto al control normal para presentar el nivel de ATP intracelular. El control negativo no se trató con el extracto o el componente activo, sino que se trató con 0,5 µg/ml de tapsigargina o 1,0 µg/ml de tunicamicina solas para inducir estrés del retículo endoplasmático. Después, el nivel de ATP intracelular se midió de la misma manera que se describió anteriormente.

Como resultado, como se muestra en la tabla 11, el daño funcional de las mitocondrias y la muerte celular de células de neuroblastoma humano inducida por el estrés del retículo endoplasmático causado por tapsigargina o tunicamicina

se recuperaron al nivel normal mediante el tratamiento del extracto en etanol al 90 % de raíz de angélica china e imperatorina (tabla 11).

[Tabla 11]

Efecto de recuperación del extracto de raíz de angélica china y su componente activo sobre la pérdida de ATP intracelular			
Tratamiento		Inductor (µg/ml)	Contenido de ATP intracelular (% del control)
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	100,00 ± 6,06
Control negativo	-	tapsigargina, 0,5	77,89 ± 3,28
Extracto de raíz de angélica china	1,0	tapsigargina, 0,5	112,05 ± 7,21
Imperatorina	0,5	tapsigargina, 0,5	104,85 ± 5,13
Control negativo	-	tunicamicina, 1,0	69,25 ± 2,09
Extracto de raíz de angélica china	1,0	tunicamicina, 1,0	84,85 ± 3,05
Imperatorina	0,5	tunicamicina, 1,0	86,00 ± 1,18

<2-4> Expresión del gen marcador de estrés del retículo endoplasmático de acuerdo con el extracto de raíz de angélica china y su componente activo

Para investigar el efecto del extracto de raíz de angélica china de la presente invención y su componente activo sobre la recuperación del estrés del retículo endoplasmático, se midieron los niveles de expresión de los genes marcadores de estrés del retículo endoplasmático, *GRP78* y *XBP1p*.

Particularmente, se cultivaron células SH-SY5Y de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <2-2> y se indujo estrés del retículo endoplasmático. Después, Se realizó RT-PCR con las células que tenían estrés del retículo endoplasmático de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-4>, seguida de electroforesis para investigar los niveles de expresión de los genes *GRP78* y *XBP1p* en gel de agarosa al 1,5 % bajo UV. El control normal no se trató con el extracto de la invención o el componente activo del mismo, sino que se trató con DMSO solo. El control negativo no se trató con el extracto o el componente activo, sino que se trató con 0,5 µg/ml de tapsigargina sola para inducir estrés del retículo endoplasmático. Después, La expresión del gen marcador de estrés del retículo endoplasmático se confirmó de la misma manera que se describió anteriormente.

Como resultado, como se muestra en la tabla 12 y la tabla 13, los niveles de expresión de los genes marcadores de estrés del retículo endoplasmático *GRP78* y *XBP1p* se recuperaron al nivel normal en las células que presentaban estrés del retículo endoplasmático inducido por el tratamiento del extracto en etanol al 90 % de raíz de angélica china e imperatorina (tablas 12 y 13).

[Tabla 12]

Expresión del ARNm de <i>GRP78</i> de acuerdo con el extracto de raíz de angélica china y su componente activo en células que presentan estrés del retículo endoplasmático inducido por tapsigargina			
Tratamiento		Inductor (tapsigargina, µg/ml)	<i>GRP78</i> /ARNm 18S
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	1,93 ± 0,03
Control negativo	-	0,5	100,00 ± 2,37
Extracto de raíz de angélica china	1,0	0,5	2,78 ± 0,03
Imperatorina	0,5	0,5	2,97 ± 0,05

[Tabla 13]

Expresión del ARNm de <i>XBP1p</i> de acuerdo con el extracto de raíz de angélica china y su componente activo en células que presentan estrés del retículo endoplasmático inducido por tapsigargina			
Tratamiento		Inductor (tapsigargina, µg/ml)	XBP1p/ARNm 18S
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	3,58 ± 0,06
Control negativo	-	0,5	100,00 ± 3,18
Extracto de raíz de angélica china	1,0	0,5	4,89 ± 0,07
Imperatorina	0,5	0,5	4,01 ± 0,05

Ejemplo experimental 3 (no de acuerdo con la invención): Evaluación de la eficacia intracelular del extracto de raíz de hierba gitana y su componente activo

<3-1> Efecto del extracto de raíz de hierba gitana y su componente activo sobre la tasa de supervivencia celular

- 5 Para evaluar la eficacia intracelular del extracto de raíz de hierba gitana de la presente invención y su componente activo, se investigó la citotoxicidad en células microgliales murinas.

Particularmente, BV2, la línea celular microglial de ratón, se inoculó en DMEM 1:1 (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco; Gibco, EE. UU.) complementado con FBS al 10 %, seguido de cultivo a una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %/aire al (O<sub>2</sub>) 95 %. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 2,5X10<sup>4</sup> células/pocillo. Las células se trataron con el extracto en etanol al 90 % de raíz de hierba gitana preparado en el ejemplo <1-3>, saikosaponina A, saikosaponina B2, saikosaponina B4 o saikosaponina D a la concentración de 1,0 µg/ml durante 4 horas. Las células se recogieron y la tasa de supervivencia celular se midió usando calceína. La tasa de supervivencia de las células que aumentó o disminuyó en comparación con la de las células de control normales no tratadas con el extracto o su componente activo anterior y en su lugar tratadas con DMSO se calculó y se presentó como porcentaje (%).

Como resultado, como se muestra en la Tabla 14 posterior, el extracto de raíz de hierba gitana y su componente activo no mostraron citotoxicidad en células normales (tabla 14).

[Tabla 14]

Efecto del extracto de raíz de hierba gitana y su componente activo sobre la tasa de supervivencia celular			
Sustancia de tratamiento		Conc. (µg/ml)	Tasa de supervivencia celular (% del control)
Control normal		-	100,00 ± 6,48
Extracto de raíz de hierba gitana y su componente activo	Extracto en etanol al 90 %	1,0	101,46 ± 9,38
	Saikosaponina A	1,0	98,38 ± 7,69
	saikosaponina B2	1,0	102,74 ± 8,55
	saikosaponina B4	1,0	97,99 ± 2,86
	saikosaponina	1,0	97,45 ± 3,99

- 20 <3-2> Efecto inhibitor del extracto de raíz de hierba gitana y su componente activo sobre la muerte celular inducida por respuesta inflamatoria

Para investigar el efecto inhibitor del extracto de la raíz de hierba gitana de la presente invención y su principio activo sobre la respuesta inflamatoria, se realizó un ensayo MTT con las células que presentaban una respuesta inflamatoria inducida por lipopolisacárido (LPS) para confirmar el efecto de recuperación sobre el daño del complejo 1 mitocondrial en células vivas.

- 25 Particularmente, se cultivaron células BV2 de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <3-1>. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 1 x10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células se trataron con el extracto en etanol al 90 % de raíz de hierba gitana preparado en el ejemplo <1-3>, saikosaponina A, saikosaponina B2, saikosaponina B4 o saikosaponina D a la concentración de 1,0 µg/ml, seguido de

cultivo durante 4 horas. Las células se trataron después a 100 ng/ml de lipopolisacárido (LPS), seguido de cultivo durante 20 horas para inducir respuesta inflamatoria. Se realizó ensayo de MTT con las células inducidas con respuesta inflamatoria de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-2>. Se confirmó que el daño del complejo 1 mitocondrial observó cómo aumentaba o disminuía el nivel de daño, en comparación con el grupo de control normal tratado con DMSO sin el extracto o su componente activo. Mientras tanto, el grupo de control negativo se trató con 100 ng/ml de LPS solo para inducir respuesta inflamatoria y no se trató con el extracto o su componente activo. Después, el ensayo de MTT se realizó de la misma manera que se describió anteriormente.

Como resultado, como se muestra en la Tabla 15 posterior, la respuesta inflamatoria inducida por LPS se recuperó al nivel normal mediante el tratamiento del extracto en etanol al 90 % de raíz de hierba gitana, saikosaponina A, saikosaponina B2, saikosaponina B4 o saikosaponina D (tabla 15).

[Tabla 15]

Efecto de recuperación del extracto de corteza de raíz de hierba gitana y su componente activo sobre el daño del complejo 1 mitocondrial			
Tratamiento		Inductor (LPS, ng/ml)	MTT (% del control)
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	100,00 ± 9,56
Control negativo	-	100	52,17 ± 7,86
Extracto de raíz de hierba gitana	1,0	100	89,06 ± 6,78
saikosaponina A	1,0	100	91,49 ± 6,20
saikosaponina B2	1,0	100	88,85 ± 6,48
saikosaponina B4	1,0	100	87,12 ± 2,56
saikosaponina D	1,0	100	86,73 ± 1,25

<3-3> Reducción de la respuesta inflamatoria dependiente de óxido nítrico (NO) por el extracto de raíz de hierba gitana y su componente activo

Para investigar el efecto de recuperación del extracto de la raíz de hierba gitana de la presente invención y su componente activo sobre la respuesta inflamatoria, se realizó el procedimiento de Griess para medir la concentración de nitrito/nitrato (NOx) en el medio de cultivo celular.

Particularmente, se cultivaron células BV2 de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <3-1> y se indujo una respuesta inflamatoria. Después, se obtuvieron 100 µl del medio de cultivo celular, a los que se añadieron 100 de reactivos de Griess que comprendía ácido clorhídrico que contenía sulfanilamida al 5 % y naftiletildiamina al 2 %, seguido de reacción en una sala oscura durante 30 minutos. Una vez completada la reacción, se midió la DO<sub>540</sub> con un lector de microplacas EISA (Versamax, EE. UU.). La concentración de óxido nítrico en el medio se calculó usando la curva de calibración estándar de nitrito de sodio. El control normal no se trató con el extracto o el componente activo del mismo, sino que se trató con DMSO. El control negativo se trató con 100 ng/ml de LPS solo para inducir una respuesta inflamatoria pero no se trató con el extracto o el componente activo. Después, el efecto de reducción de la concentración de óxido nítrico se investigó de la misma manera que se describió anteriormente.

Como resultado, como se muestra en la tabla 16, se confirmó que el extracto en etanol al 90 % de raíz de hierba gitana, saikosaponina A, saikosaponina B2, saikosaponina B4 y saikosaponina D tienen el efecto de suprimir la generación de NO mediada por LPS (tabla 16).

[Tabla 16]

Efecto de reducción de la concentración de óxido nítrico (NO) del extracto de raíz de hierba gitana y su componente activo			
Tratamiento		Inductor (LPS, ng/ml)	NO (mM)
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	3,29 ± 0,03
Control negativo	-	100	28,17 ± 4,73

(continuación)

Efecto de reducción de la concentración de óxido nítrico (NO) del extracto de raíz de hierba gitana y su componente activo			
Tratamiento		Inductor (LPS, ng/ml)	NO (mM)
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)		
Extracto de raíz de hierba gitana	1,0	100	13,06 ± 2,34
saikosaponina A	1,0	100	10,75 ± 3,60
saikosaponina B2	1,0	100	18,97 ± 2,68
saikosaponina B4	1,0	100	17,21 ± 2,11
saikosaponina D	1,0	100	18,12 ± 2,93

<3-4> Expresión del gen marcador de respuesta inflamatoria de acuerdo con el extracto de raíz de hierba gitana y su componente activo

Para investigar el efecto del extracto de la raíz de hierba gitana de la presente invención y su componente activo sobre la recuperación de la respuesta inflamatoria, los niveles de expresión de los genes marcadores de la respuesta inflamatoria, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), interleucina-6, (*IL-6*) y *NF-kB p65/RelA*.

Particularmente, se cultivaron células BV2 de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <3-1> y se indujo una respuesta inflamatoria. Después, Se realizó RT-PCR con las células de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-4>, seguida por un análisis cuantitativo de los niveles de expresión de los genes *iNOS*, *IL-6* y *NF-kB p65/RelA*. El control normal no se trató con el extracto de la invención o el componente activo del mismo, sino que se trató con DMSO solo. El control negativo no se trató con el extracto o el componente activo, sino que se trató con 100 ng/ml de LPS solo para inducir respuesta inflamatoria. Después, La expresión del gen marcador de respuesta inflamatoria se confirmó de la misma manera que se describió anteriormente.

Como resultado, como se muestra en las Tablas 17 ~ 19, los niveles de expresión de los genes marcadores de la respuesta inflamatoria, *iNOS*, *IL-6* y *NF-kB p65/RelA* se recuperaron al nivel normal en las células que presentaban una respuesta inflamatoria inducida en ellas por el tratamiento del extracto en etanol al 90 % de raíz de hierba gitana, saikosaponina A, saikosaponina B2, saikosaponina B4 y saikosaponina D (tablas 17 ~ 19).

[Tabla 17]

Expresión de ARNm de <i>iNOS</i> de acuerdo con el extracto de raíz de hierba gitana y su componente activo			
Tratamiento		Inductor (LPS, ng/ml)	ARNm de <i>iNOS</i> (% del control)
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	0,52 ± 0,01
Control negativo	-	100	100,00 ± 1,82
Extracto de raíz de hierba gitana	1,0	100	15,25 ± 0,11
saikosaponina A	1,0	100	14,85 ± 1,47
saikosaponina B2	1,0	100	18,11 ± 2,39
saikosaponina B4	1,0	100	26,06 ± 3,27
saikosaponina D	1,0	100	21,23 ± 1,99

[Tabla 18]

Expresión de ARNm de <i>IL-6</i> de acuerdo con el extracto de raíz de hierba gitana y su componente activo			
Tratamiento		Inductor (LPS, ng/ml)	ARNm de <i>IL-6</i> (% del control)
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	1,18 ± 0,07

(continuación)

Expresión de ARNm de <i>IL-6</i> de acuerdo con el extracto de raíz de hierba gitana y su componente activo			
Tratamiento		Inductor (LPS, ng/ml)	ARNm de <i>IL-6</i> (% del control)
Sustancia de tratamiento	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Control negativo	-	100	100,00 $\pm$ 3,73
Extracto de raíz de hierba gitana	1,0	100	26,30 $\pm$ 2,37
saikosaponina A	1,0	100	18,05 $\pm$ 1,23
saikosaponina B2	1,0	100	29,67 $\pm$ 2,39
saikosaponina B4	1,0	100	28,53 $\pm$ 1,92
saikosaponina D	1,0	100	26,58 $\pm$ 1,75

[Tabla 19]

Expresión de ARNm de <i>p65/RelA</i> de acuerdo con el extracto de raíz de hierba gitana y su componente activo			
Tratamiento		Inductor (LPS, ng/ml)	ARNm de <i>p65/RelA</i> (% del control)
Sustancia de tratamiento	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Control normal	-	-	11,48 $\pm$ 0,53
Control negativo	-	100	100,00 $\pm$ 1,12
Extracto de raíz de hierba gitana	1,0	100	46,01 $\pm$ 3,19
saikosaponina A	1,0	100	40,38 $\pm$ 1,05
saikosaponina B2	1,0	100	50,18 $\pm$ 2,67
saikosaponina B4	1,0	100	53,70 $\pm$ 4,72
saikosaponina D	1,0	100	49,80 $\pm$ 3,54

<3-5> Reducción de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por el extracto de raíz de hierba gitana y su componente activo

5 Para investigar el efecto de recuperación del extracto de raíz de hierba gitana de la presente invención y el componente activo del mismo sobre la respuesta inflamatoria, la concentración de ROS intracelular se midió usando diacetato de 2',7'-diclorofluorosceína (DCF-DA).

10 Particularmente, se cultivaron células BV2 de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <3-1> y se indujo una respuesta inflamatoria. Después, las células inducidas con respuesta inflamatoria se trataron con DCF-DA 1  $\mu\text{M}$  y bisbencimida 0,05  $\mu\text{M}$  (Hoechst 33342), seguido por tinción a 37 °C durante 1 hora. Después de la tinción, se midió la intensidad de fluorescencia de DCF-DA a 485 nm/535 nm, y se midió la intensidad de fluorescencia de bisbencimida a 335 nm/460 nm. Basándose en la proporción de DCF-DA/bisbencimida, se cuantificó ROS. La cantidad de ROS, ya sea aumentada o disminuida, se comparó con la del control normal que no se trató con el extracto o el componente activo del mismo, pero se trató con DMSO, y los resultados se presentaron como %. El control negativo se trató con 100 ng/ml de LPS solo para inducir una respuesta inflamatoria pero no se trató con el extracto o el componente activo del mismo. Después, la generación de ROS se investigó de la misma manera que se describió anteriormente.

15 Como resultado, como se muestra en la tabla 20, se confirmó que el extracto en etanol al 90 % de raíz de hierba gitana, saikosaponina A, saikosaponina B2, saikosaponina B4 y saikosaponina D tienen el efecto de reducir la generación de ROS mediada por DCF-DA causada por la respuesta inflamatoria y el estrés (tabla 20).

20



[Tabla 20]

Efecto de reducción de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) del extracto de raíz de hierba gitana y su componente activo			
Tratamiento		Inductor (LPS, g/ml)	DCF-DA-ROS (% del control)
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	100,00 ± 1,09
Control negativo	-	100	412,31 ± 4,26
Extracto en etanol al 90 %	1,0	100	235,45 ± 2,27
saikosaponina A	1,0	100	198,24 ± 3,72
saikosaponina B2	1,0	100	214,22 ± 1,87
saikosaponina B4	1,0	100	223,26 ± 2,86
saikosaponina D	1,0	100	218,61 ± 2,71

Ejemplo experimental 4 (no de acuerdo con la invención): Evaluación de la eficacia intracelular de extracto de mezcla que comprende al menos dos de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana

5 <4-1> Efecto de recuperación de extracto de mezcla que comprende al menos dos de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la actividad mitocondrial en el modelo celular de enfermedad de Parkinson

10 Para investigar el efecto de recuperación del extracto de la mezcla que comprende al menos dos de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la actividad mitocondrial en el modelo celular de enfermedad de Parkinson, el índice de actividad mitocondrial se examinó en el modelo celular de enfermedad de Parkinson.

15 Particularmente, SH-SY5Y, la línea celular de neuroblastoma humano, se inoculó en DMEM/F12 (1:1) complementado con FBS al 10 %, seguido de cultivo a una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %/ aire al (O<sub>2</sub>) 95 %. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 1 x10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células se trataron con el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china preparado en el ejemplo 2, el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía y raíz de hierba gitana preparado en el ejemplo 3, el extracto mixto en etanol al 90 % de raíz de angélica china y raíz de hierba gitana preparado en el ejemplo 4, o el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana preparado en el ejemplo <5-1> a la concentración de 1 µg/ml, seguido de cultivo durante 4 horas. Una vez completado el cultivo, las células se trataron con 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) a una concentración de 1 mM, seguido de cultivo durante 24 horas. Como resultado, se construyó el modelo celular de enfermedad de Parkinson. Después, la tasa de supervivencia celular se midió de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-1> usando calceína. La tasa de supervivencia celular que aumentó o disminuyó en comparación con la de las células de control normales no tratadas con el extracto o su componente activo anterior y en su lugar tratadas con DMSO se calculó y se presentó como porcentaje (%). El control negativo se trató con MPP+ 1 mM solo, dando como resultado la construcción del modelo celular de enfermedad de Parkinson que no se había tratado con el extracto o el componente activo del mismo. Después, la tasa de supervivencia celular también se midió, ya sea aumentada o disminuida, comparándola con la del control normal, de la misma manera que se describió anteriormente.

25 Como resultado, como se muestra en la tabla 21, la tasa de supervivencia celular del modelo celular de enfermedad de Parkinson de acuerdo con la reducción de la actividad mitocondrial causada por MPP+ se recuperó del 65 ~ 70 % por el tratamiento del extracto de mezcla, precisamente el extracto en etanol de la mezcla que comprende corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana a diversas proporciones de mezcla. Mientras tanto, el efecto de recuperación aumentó y alcanzó el 77 ~ 81 % mediante el tratamiento del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía y raíz de hierba gitana, el extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china y el extracto de la mezcla de raíz de angélica china y raíz de hierba gitana. En particular, el efecto de recuperación que fue el más alto, que fue del 92,84 %, cuando se trató el extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (tabla 21).

[Tabla 21]

Efecto del extracto de mezcla que comprende al menos dos de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la tasa de supervivencia celular				
Tratamiento			Inductor (MPP+, M)	Tasa de supervivencia celular (% del control)
Composición mixta	Proporción de mezcla	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		
Control normal	-	-	-	100,00 $\pm$ 4,70
Control negativo	-	-	1,0	51,56 $\pm$ 2,24
Corteza de raíz de peonía	-	1,0	1,0	69,91 $\pm$ 2,18
Raíz de angélica china	-	1,0	1,0	65,19 $\pm$ 2,87
Raíz de hierba gitana	-	1,0	1,0	68,68 $\pm$ 1,78
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china	1:5	1,0	1,0	78,33 $\pm$ 3,89
de angélica china	1:1	1,0	1,0	80,45 $\pm$ 4,02
	1:0,2	1,0	1,0	78,24 $\pm$ 3,59
Corteza de raíz de peonía + raíz de hierba gitana	1:5	1,0	1,0	78,36 $\pm$ 2,35
	1:1	1,0	1,0	81,00 $\pm$ 4,08
	1:0,2	1,0	1,0	78,31 $\pm$ 3,16
Raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1:5	1,0	1,0	78,22 $\pm$ 2,14
	1:1	1,0	1,0	79,26 $\pm$ 3,18
	1:0,2	1,0	1,0	77,98 $\pm$ 1,91
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1:1:1	1,0	1,0	92,84 $\pm$ 5,51

<4-2> Efecto de recuperación de extracto de mezcla que comprende al menos dos de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la pérdida de ATP en el modelo celular de enfermedad de Parkinson

5 Para investigar el efecto del extracto de la mezcla que comprende al menos dos de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la recuperación del daño funcional mitocondrial en el modelo celular de enfermedad de Parkinson, se realizó un ensayo con ATP para confirmar el efecto de recuperación sobre la pérdida de ATP en las células.

10 Particularmente, SH-SY5Y, la línea celular de neuroblastoma humano, se inoculó en DMEM/F12 (1:1) complementado con FBS al 10 %, seguido de cultivo a una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %/ aire al (O<sub>2</sub>) 95 %. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 1 x10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células se trataron con el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china preparado en el ejemplo 2, el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía y raíz de hierba gitana preparado en el ejemplo 3, el extracto mixto en etanol al 90 % de raíz de angélica china y raíz de hierba gitana preparado en el ejemplo 4, o el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana preparado en el ejemplo 5, a la concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , seguido de cultivo durante 4 horas. Una vez completado el cultivo, se construyó el modelo celular de enfermedad de Parkinson de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <4-1>. Después, el nivel de ATP intracelular se midió de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-3>. El aumento o la disminución del nivel de ATP intracelular se calculó comparando el del control normal que no se había tratado con el extracto o el componente activo, pero se trató con DMSO solo. El control negativo se trató con MPP+ 1 mM solo pero no se trató con el extracto o el componente activo, seguido de la investigación de la recuperación del nivel de ATP de la misma manera que se describió anteriormente. El control negativo se trató con MPP+ 1 mM solo, dando como resultado la construcción del modelo celular de enfermedad de Parkinson que no se había tratado con el extracto o el componente activo del mismo. Después, el efecto de recuperación sobre el nivel de ATP intracelular se investigó de la misma manera que se describió anteriormente.

25 Como resultado, como se muestra en la tabla 22, la pérdida de ATP intracelular de acuerdo con la disminución de la actividad mitocondrial causada por 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) se recuperó mediante el tratamiento del extracto único en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china o raíz de hierba gitana hasta el 68 ~ 69 % por el nivel del grupo normal. Mientras tanto, la tasa de recuperación se incrementó hasta el 78 ~ 83 % mediante el

tratamiento del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía y hierba gitana, el extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía y angélica china y el extracto de la mezcla de raíz de angélica china y raíz de hierba gitana. En particular, la tasa de recuperación fue la más alta hasta el 95,82 % cuando se trató el extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (tabla 22).

5

[Tabla 22]

Efecto del extracto de la mezcla que comprende al menos dos de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la pérdida de ATP intracelular				
Tratamiento			Inductor (MPP+, mM)	ATP intracelular (% del control)
Composición mixta	Proporción de mezcla	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	-	100,00 ± 2,99
Control negativo	-	-	1,0	57,13 ± 3,17
Corteza de raíz de peonía	-	1,0	1,0	69,28 ± 2,37
Raíz de angélica china	-	1,0	1,0	68,99 ± 3,57
Raíz de hierba gitana	-	1,0	1,0	68,63 ± 2,49
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china	1:5	1,0	1,0	78,44 ± 3,44
	1:1	1,0	1,0	79,84 ± 3,01
	1:0,2	1,0	1,0	78,50 ± 2,68
Corteza de raíz de peonía + raíz de hierba gitana	1:5	1,0	1,0	80,93 ± 1,25
	1:1	1,0	1,0	83,56 ± 3,15
	1:0,2	1,0	1,0	81,43 ± 2,36
Raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1:5	1,0	1,0	78,29 ± 1,11
	1:1	1,0	1,0	81,39 ± 2,89
	1:0,2	1,0	1,0	79,92 ± 2,31
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1:1:1	1,0	1,0	95,82 ± 3,61

<4-3> Reducción de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el modelo celular de enfermedad de Parkinson por el extracto de la mezcla que comprende al menos dos de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana

- 10 Para investigar el efecto de reducción en la generación de ROS causada por daño funcional mitocondrial en el modelo celular de enfermedad de Parkinson de acuerdo con el tratamiento del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía y hierba gitana, el extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía y angélica china, el extracto de la mezcla de raíz de angélica china y raíz de hierba gitana, y el extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana, la concentración de ROS intracelular se midió usando diacetato de 2',7'-diclorofluorosceína (DCF-DA).
- 15 Particularmente, SH-SY5Y, la línea celular de neuroblastoma humano, se inoculó en DMEM/F12 (1:1) complementado con FBS al 10 %, seguido de cultivo a una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %/ aire al (O<sub>2</sub>) 95 %. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 1 x10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células se trataron con el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china preparado en el ejemplo 2, el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía y raíz de hierba gitana preparado en el ejemplo 3, el extracto mixto en etanol al 90 % de raíz de angélica china y raíz de hierba gitana preparado en el ejemplo 4, o el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana preparado en el ejemplo <5-1> a la concentración de 1 µg/ml, seguido de cultivo durante 4 horas. Una vez completado el cultivo, Se construyó el modelo celular de enfermedad de Parkinson de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <4-1>. Después, se cuantificó ROS basándose en la proporción de DCF-DA/bisbencimida de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <3-5>. El nivel de ROS, ya sea aumentado o disminuido, se comparó con el del control normal que no se trató con el extracto o el componente activo del mismo, pero se trató con DMSO, y los resultados se presentaron como % mediante el control normal. El modelo celular de enfermedad de Parkinson de control negativo se construyó mediante el tratamiento de MPP+ 1 mM solo pero no se trató con el extracto
- 25

o el componente activo del mismo. Después, el efecto de reducción de la generación de ROS se investigó de la misma manera que se describió anteriormente.

5 Como resultado, como se muestra en la tabla 23, la generación de ROS como resultado de la disminución de la actividad mitocondrial causada por 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) se recuperó hasta un 144 ~ 146 % respecto al nivel normal después del tratamiento del extracto individual en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china o raíz de hierba gitana, mientras que la generación de ROS se recuperó hasta el 120 ~ 132 % respecto al nivel normal después del tratamiento del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía y hierba gitana, el extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía y angélica china y el extracto de la mezcla de raíz de angélica china y raíz de hierba gitana. En particular, la generación de ROS se recuperó casi al nivel normal, que fue del 108,20 %, mediante el tratamiento del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana, lo que sugiere que el extracto de la mezcla anterior tuvo el mayor efecto de recuperación (tabla 23).

[Tabla 23]

Efecto de reducción de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) del extracto de la mezcla que comprende al menos dos de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana				
Tratamiento			Inductor (MPP+, mM)	DCF-DA-ROS (% del control)
Composición mixta	Proporción de mezcla	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	-	100,00 ± 3,60
Control negativo	-	-	1,0	165,85 ± 4,67
Corteza de raíz de peonía	-	1,0	1,0	146,91 ± 5,05
Raíz de angélica china	-	1,0	1,0	144,44 ± 2,97
Raíz de hierba gitana	-	1,0	1,0	145,67 ± 5,88
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china	1:5	1,0	1,0	125,01 ± 2,39
	1:1	1,0	1,0	124,69 ± 2,79
	1:0,2	1,0	1,0	128,55 ± 1,75
	1:5	1,0	1,0	122,23 ± 1,03
Corteza de raíz de peonía + raíz de hierba gitana	1:1	1,0	1,0	120,82 ± 2,37
	1:0,2	1,0	1,0	123,82 ± 1,23
Raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1:5	1,0	1,0	131,86 ± 1,67
	1:1	1,0	1,0	130,99 ± 3,78
	1:0,2	1,0	1,0	132,71 ± 4,54
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1:1:1	1,0	1,0	108,20 ± 1,90

Ejemplo experimental 5: Evaluación de la eficacia intracelular de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con diferentes proporciones de mezcla

15 <5-1> Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con diferentes proporciones de mezcla sobre la actividad mitocondrial en el modelo celular de enfermedad de Parkinson

20 Para investigar el efecto de recuperación del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con diferentes proporciones de mezcla sobre la actividad mitocondrial en el modelo celular de enfermedad de Parkinson, el índice de actividad mitocondrial se confirmó en primer lugar para comparar el efecto de recuperación.

25 Particularmente, SH-SY5Y, la línea celular de neuroblastoma humano, se inoculó en DMEM/F12 (1:1) complementado con FBS al 10 %, seguido de cultivo a una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %/ aire al (O<sub>2</sub>) 95 %. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 1 x10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células se trataron con los diversos extractos mixtos en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china que tenían diferentes proporciones de mezcla preparados en el ejemplo 5 a la concentración de 1 µg/ml, seguido de cultivo durante 4 horas. Una vez completado el cultivo, se construyó el modelo celular de enfermedad de Parkinson de la

5 misma manera que se describe en el ejemplo experimental <4-1>. Después, la tasa de supervivencia celular se midió usando calceína de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-1>. La tasa de supervivencia celular que aumentó o disminuyó en comparación con la del grupo de control normal no tratado con el extracto o su componente activo anterior, pero tratado con DMSO se calculó y se presentó como porcentaje (%). El modelo celular de enfermedad de Parkinson de control negativo se construyó mediante el tratamiento de MPP+ 1 mM solo pero no se trató con el extracto o el componente activo del mismo. Después, la tasa de supervivencia celular que aumentó o disminuyó en comparación con la del grupo de control normal se calculó y se presentó como porcentaje (%) de la misma manera que se describió anteriormente.

10 Como resultado, como se muestra en la tabla 24, la actividad mitocondrial reducida causada por 1-metil-4-fenilpiridinio se recuperó hasta un 93,22 % respecto al control normal después del tratamiento del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1), que fue el más alto (tabla 24).

[Tabla 24]

Efecto de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con diferentes proporciones de mezcla sobre la tasa de supervivencia celular				
Tratamiento			Inductor (MPP+, mM)	Tasa de supervivencia celular (% del control)
Composición mixta	Proporción de mezcla*	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	-	100,00 ± 4,55
Control negativo	-	-	1,0	55,24 ± 3,74
Extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1:1:1	1,0	1,0	93,22 ± 3,92
	1:1:2	1,0	1,0	84,26 ± 2,62
	1:2:1	1,0	1,0	85,61 ± 2,44
	1:2:2	1,0	1,0	86,30 ± 5,38
	1:1:0,5	1,0	1,0	84,27 ± 4,51
	1:0,5:1	1,0	1,0	83,72 ± 4,65
	1:0,5:0,5	1,0	1,0	86,88 ± 0,42
	1:1:3	1,0	1,0	86,78 ± 2,71
	1:3:1	1,0	1,0	84,87 ± 2,92
	1:3:3	1,0	1,0	84,06 ± 3,25
	1:1:0,33	1,0	1,0	84,50 ± 4,83
	1:0,33:1	1,0	1,0	86,16 ± 3,99
	1:0,33:0,33	1,0	1,0	83,89 ± 4,83
	1:1:4	1,0	1,0	87,56 ± 2,82
	1:4:1	1,0	1,0	84,88 ± 3,59
	1:4:4	1,0	1,0	85,65 ± 5,92
	1:1:0,25	1,0	1,0	86,30 ± 2,42
	1:0,25:1	1,0	1,0	87,99 ± 2,92
	1:0,25:0,25	1,0	1,0	85,17 ± 1,76
	1:1:5	1,0	1,0	86,22 ± 0,82
1:5:1	1,0	1,0	86,21 ± 0,72	
1:5:5	1,0	1,0	86,31 ± 2,19	
1:1:0,2	1,0	1,0	84,14 ± 1,81	
1:0,2:1	1,0	1,0	85,20 ± 3,02	
1:0,2:0,2	1,0	1,0	84,47 ± 1,21	

\* La proporción de mezcla del extracto de la mezcla es la proporción en peso de corteza de raíz de peonía:raíz de angélica china:raíz de hierba gitana (p:p:p).

<5-2> Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con diferentes proporciones de mezcla sobre la pérdida de ATP intracelular en el modelo

celular de enfermedad de Parkinson

5 Para investigar el efecto del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con diferentes proporciones de mezcla sobre la recuperación del daño funcional mitocondrial en el modelo celular de enfermedad de Parkinson, se realizó un ensayo con ATP para confirmar el efecto de recuperación sobre la pérdida de ATP intracelular.

10 Particularmente, SH-SY5Y, la línea celular de neuroblastoma humano, se inoculó en DMEM/F12 (1:1) complementado con FBS al 10 %, seguido de cultivo a una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %/ aire al (O<sub>2</sub>) 95 %. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 1 x10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células se trataron con los diversos extractos mixtos en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china que tenían diferentes proporciones de mezcla preparados en el ejemplo 5 a la concentración de 1 µg/ml, seguido de cultivo durante 4 horas. Una vez completado el cultivo, se construyó el modelo celular de enfermedad de Parkinson de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <4-1>. Después, el nivel de ATP intracelular se midió de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-3>. El nivel de ATP intracelular que aumentó o disminuyó en comparación con el del grupo de control normal no tratado con el extracto o su componente activo anterior, pero tratado con DMSO se calculó y se presentó como porcentaje (%). El modelo celular de enfermedad de Parkinson de control negativo se construyó mediante el tratamiento de MPP+ 1 mM solo pero no se trató con el extracto o el componente activo del mismo. A continuación, el efecto de recuperación sobre la pérdida de ATP intracelular se confirmó de la misma manera que se describió anteriormente.

20 Como resultado, como se muestra en la tabla 25, la pérdida de ATP intracelular causada por 1-metil-4-fenilpiridinio se recuperó hasta un 94,10 % respecto al control normal después del tratamiento del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1), que fue el más alto (tabla 25).

[Tabla 25]

Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con diferentes proporciones de mezcla sobre la pérdida de ATP intracelular				
Tratamiento			Inductor (MPP+, mM)	ATP intracelular
Composición mixta	Proporción de mezcla*	Conc. (µg/ml)		contenido (% del control)
Control normal	-	-	-	100,00 ± 1,73
Control negativo	-	-	1,0	60,88 ± 1,35
Extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1:1:1	1,0	1,0	94,10 ± 3,56
	1:1:2	1,0	1,0	85,22 ± 1,89
	1:2:1	1,0	1,0	87,47 ± 2,61
	1:2:2	1,0	1,0	87,00 ± 2,18
	1:1:0,5	1,0	1,0	85,18 ± 1,89
	1:0,5:1	1,0	1,0	90,22 ± 3,96
	1:0,5:0,5	1,0	1,0	86,32 ± 2,12
	1:1:3	1,0	1,0	88,14 ± 2,44
	1:3:1	1,0	1,0	87,21 ± 2,39
	1:3:3	1,0	1,0	87,47 ± 1,92
	1:1:0,33	1,0	1,0	88,17 ± 2,15
	1:0,33:1	1,0	1,0	88,24 ± 2,59
	1:0,33:0,33	1,0	1,0	86,99 ± 1,44
	1:1:4	1,0	1,0	86,21 ± 3,60
	1:4:1	1,0	1,0	84,51 ± 0,13
	1:4:4	1,0	1,0	86,99 ± 1,39
1:1:0,25	1,0	1,0	87,72 ± 4,32	
1:0,25:1	1,0	1,0	85,14 ± 1,84	

(continuación)

Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con diferentes proporciones de mezcla sobre la pérdida de ATP intracelular				
Tratamiento			Inductor (MPP+, mM)	ATP intracelular
Composición mixta	Proporción de mezcla*	contenido (% del control)		
	1:0,25:0,25	1,0	1,0	87,45 ± 3,44
	1:1:5	1,0	1,0	86,29 ± 3,92
	1:5:1	1,0	1,0	84,01 ± 1,85
	1:5:5	1,0	1,0	87,70 ± 1,59
	1:1:0,2	1,0	1,0	87,38 ± 2,60
	1:0,2:1	1,0	1,0	87,68 ± 3,14
	1:0,2:0,2	1,0	1,0	89,34 ± 3,12

\* La proporción de mezcla del extracto de la mezcla es la proporción en peso de corteza de raíz de peonía:raíz de angélica china:raíz de hierba gitana (p:p:p).

<5-3> Efecto de reducción de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con diferentes proporciones de mezcla en el modelo celular de enfermedad de Parkinson

5 Para investigar el efecto de recuperación del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con diferentes proporciones de mezcla en el modelo celular de enfermedad de Parkinson, la concentración de ROS intracelular se midió usando diacetato de 2',7'-diclorofluorosceína (DCF-DA).

10 Particularmente, BV2, la línea celular microglial de ratón, se inoculó en DMEM/F12 (1:1) complementado con FBS al 10 %, seguido de cultivo a una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %/ aire al (O<sub>2</sub>) 95 %. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 1 x 10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células se trataron con los diversos extractos mixtos en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china que tenían diferentes proporciones de mezcla preparados en el ejemplo 5 a la concentración de 1 µg/ml, seguido de cultivo durante 4 horas. Una vez completado el cultivo, se construyó el modelo celular de enfermedad de Parkinson de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <4-1>. Después, se cuantificó ROS basándose en la proporción de DCF-DA/bisbencimida de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <3-5>. El nivel de ROS, ya sea aumentado o disminuido, se comparó con el del control normal que no se trató con el extracto o el componente activo del mismo, pero se trató con DMSO, y los resultados se presentaron como % mediante el control normal. El modelo celular de enfermedad de Parkinson de control negativo se construyó mediante el tratamiento de MPP+ 1 mM solo pero no se trató con el extracto o el componente activo del mismo. Después, el efecto de reducción de la generación de ROS se investigó de la misma manera que se describió anteriormente.

20 Como resultado, como se muestra en la tabla 26, la generación de ROS resultante de la actividad mitocondrial reducida causada por 1-metil-4-fenilpiridinio se recuperó hasta un 106,23 % respecto al control normal después del tratamiento del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1), que fue el más alto (tabla 26).

[Tabla 26]

Efecto de reducción de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con diferentes proporciones de mezcla				
Tratamiento			Inductor	DCF-DA-ROS
Composición mixta	Proporción de mezcla*	Conc. (µg/ml)	(MPP+, mM)	(% del control)
Control normal	-	-	-	100,00 ± 1,78
Control negativo	-	-	1,0	162,14 ± 0,33
Extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1:1:1	1,0	1,0	106,23 ± 1,76
	1:1:2	1,0	1,0	112,70 ± 2,46
	1:2:1	1,0	1,0	114,79 ± 1,79

25

(continuación)

Efecto de reducción de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con diferentes proporciones de mezcla				
Tratamiento			Inductor	DCF-DA-ROS
Composición mixta	Proporción de mezcla*	Conc. (µg/ml)	(MPP+, mM)	(% del control)
	1:2:2	1,0	1,0	111,66 ± 1,73
	1:1:0,5	1,0	1,0	114,60 ± 1,39
	1:0,5:1	1,0	1,0	112,24 ± 2,03
	1:0,5:0,5	1,0	1,0	114,84 ± 3,51
	1:1:3	1,0	1,0	112,02 ± 2,65
	1:3:1	1,0	1,0	113,82 ± 2,11
	1:3:3	1,0	1,0	112,51 ± 2,67
	1:1:0,33	1,0	1,0	109,39 ± 1,01
	1:0,33:1	1,0	1,0	115,92 ± 1,73
	1:0,33:0,33	1,0	1,0	115,92 ± 2,94
	1:1:4	1,0	1,0	112,51 ± 3,39
	1:4:1	1,0	1,0	113,73 ± 2,78
	1:4:4	1,0	1,0	113,94 ± 2,77
	1:1:0,25	1,0	1,0	113,39 ± 2,71
	1:0,25:1	1,0	1,0	112,78 ± 1,79
	1:0,25:0,25	1,0	1,0	113,77 ± 1,86
	1:1:5	1,0	1,0	110,71 ± 2,87
	1:5:1	1,0	1,0	113,86 ± 2,75
	1:5:5	1,0	1,0	113,28 ± 2,86
	1:1:0,2	1,0	1,0	112,75 ± 1,11
	1:0,2:1	1,0	1,0	115,85 ± 1,01
	1:0,2:0,2	1,0	1,0	112,72 ± 3,66

\* La proporción de mezcla del extracto de la mezcla es la proporción en peso de corteza de raíz de peonía:raíz de angélica china:raíz de hierba gitana (p:p:p).

Ejemplo experimental 6: Evaluación de la eficacia intracelular de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1, p:p:p) de acuerdo con la concentración de etanol

<6-1> Cambios de componentes activos en un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1, p:p:p) de acuerdo con la concentración de etanol

- 5 Se investigaron los cambios de componentes activos en el extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con la concentración de etanol.

10 Particularmente, el disolvente de extracción etanol se añadió a la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1, p:p:p) a diferentes concentraciones del 10 %, 30 %, 50 %, 70 % y 90 %, seguido de extracción de la misma manera que se describe en el ejemplo <5-1>. Los extractos de la mezcla obtenidos procedieron a un análisis cuantitativo usando HPLC.

Como resultado, como se muestra en la tabla 27, el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1) mostró los contenidos más altos de paeonol, paeoniflorina, saikosaponina A e imperatorina (tabla 27).



[Tabla 27]

Cambios de componentes activos en un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1, p:p:p) de acuerdo con la concentración de etanol				
Concentración de etanol (%)	Contenido de componente índice (%)			
	paeonol	paeoniflorina	imperatorina	Saikosaponina A
10	1,2	2,7	0,0	0,1
30	2,5	2,2	0,2	1,0
50	4,2	2,7	0,4	1,8
70	4,4	2,2	0,6	1,5
90	4,9	4,2	1,1	1,7

<6-2> Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1, p:p:p) sobre la actividad mitocondrial de acuerdo con la concentración de etanol en el modelo celular de enfermedad de Parkinson

5 Para investigar el efecto de recuperación del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1) sobre la actividad mitocondrial de acuerdo con la concentración de etanol en el modelo celular de enfermedad de Parkinson, el índice de actividad mitocondrial se examinó en el modelo celular de enfermedad de Parkinson.

10 Particularmente, SH-SY5Y, la línea celular de neuroblastoma humano, se inoculó en DMEM/F12 (1:1) complementado con FBS al 10 %, seguido de cultivo a una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %/ aire al (O<sub>2</sub>) 95 %. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 1x10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células se trataron con los extractos mixtos en etanol de corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china (1:1:1) preparados en el ejemplo <5-1> usando diferentes concentraciones de etanol a la concentración de 1 µg/ml, seguido de cultivo durante 4 horas. Una vez completado el cultivo, se construyó el modelo celular de enfermedad de Parkinson de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <4-1>. Después, la tasa de supervivencia celular se midió de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-1> usando calceína. La tasa de supervivencia celular que aumentó o disminuyó en comparación con la de las células de control normales no tratadas con el extracto o su componente activo anterior y en su lugar tratadas con DMSO se calculó y se presentó como porcentaje (%). El control negativo se trató con MPP+ 1 mM solo, dando como resultado la construcción del modelo celular de enfermedad de Parkinson que no se había tratado con el extracto o el componente activo del mismo. Después, la tasa de supervivencia celular también se midió, ya sea aumentada o disminuida, comparándola con la del control normal, de la misma manera que se describió anteriormente.

20 Como resultado, como se muestra en la tabla 28, la actividad mitocondrial reducida por 1-metil-4-fenilpiridinio se recuperó hasta un 95,02 % respecto al control normal después del tratamiento del extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1), que fue el más alto (tabla 28).

[Tabla 28]

Efecto de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1, p:p:p) sobre la tasa de supervivencia celular de acuerdo con la concentración de etanol				
Tratamiento			Inductor (MPP+, mM)	Tasa de supervivencia celular (% del control)
Sustancia de tratamiento	Concentración de etanol %	Conc. (µg/ ml)		
Control normal	-	-	-	100,00 ± 2,05
Control negativo	-	-	1,0	53,73 ± 2,39
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana (1:1:1; p: p: p)	10	1,0	1,0	88,22 ± 1,47
	30	1,0	1,0	89,85 ± 1,55
	50	1,0	1,0	90,11 ± 1,14
	70	1,0	1,0	92,39 ± 1,74
	90	1,0	1,0	95,02 ± 2,61

<6-3> Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1, p:p:p) sobre la pérdida de ATP de acuerdo con la concentración de etanol en el modelo celular de enfermedad de Parkinson

5 Para investigar el efecto de recuperación del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1, p:p:p) sobre el daño funcional mitocondrial de acuerdo con la concentración de etanol en el modelo celular de enfermedad de Parkinson, se realizó un ensayo con ATP para confirmar el efecto de recuperación sobre la pérdida de ATP intracelular.

10 Particularmente, SH-SY5Y, la línea celular de neuroblastoma humano, se inoculó en DMEM/F12 (1:1) complementado con FBS al 10 %, seguido de cultivo a una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %/ aire al (O<sub>2</sub>) 95 %. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 1x10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células se trataron con los extractos mixtos en etanol de corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china (1:1:1) preparados en el ejemplo <5-1> usando diferentes concentraciones de etanol a la concentración de 1 µg/ml, seguido de cultivo durante 4 horas. Una vez completado el cultivo, se construyó el modelo celular de enfermedad de Parkinson de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <4-1>. Después, el nivel de ATP intracelular se midió de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-3>. El aumento o la disminución del nivel de ATP intracelular se calculó comparando el del control normal que no se había tratado con el extracto o el componente activo, pero se trató con DMSO solo. El nivel de ATP intracelular que aumentó o disminuyó en comparación con el de las células de control normales no tratadas con el extracto o su componente activo anterior y tratadas, en su lugar, con DMSO se calculó y se presentó como porcentaje (%). El control negativo se trató con MPP+ 1 mM solo, dando como resultado la construcción del modelo celular de enfermedad de Parkinson que no se había tratado con el extracto o el componente activo del mismo. Después, el efecto de recuperación sobre el nivel de ATP intracelular se investigó de la misma manera que se describió anteriormente.

20 Como resultado, como se muestra en la tabla 29, la actividad mitocondrial reducida por 1-metil-4-fenilpiridinio se recuperó hasta un 96,45 % respecto al control normal después del tratamiento del extracto mixto en etanol al 90 %, que fue la más alta (tabla 29).

[Tabla 29]

Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1, p:p:p) sobre la pérdida de ATP intracelular de acuerdo con la concentración de etanol				
Tratamiento			Inductor (MPP+, mM)	ATP intracelular (% del control)
Sustancia de tratamiento	Concentración de etanol (%)	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	-	100,00 ± 1,34
Control negativo	-	-	1,0	59,28 ± 2,45
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana (1:1:1; p:p:p)	10	1,0	1,0	89,31 ± 2,33
	30	1,0	1,0	89,34 ± 1,68
	50	1,0	1,0	90,14 ± 1,47
	70	1,0	1,0	93,81 ± 2,59
	90	1,0	1,0	96,45 ± 2,41

<6-4> Reducción de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el modelo celular de enfermedad de Parkinson por el extracto mixto en etanol de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1) de acuerdo con la concentración de etanol

30 Para investigar el efecto de reducción del extracto en etanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1) sobre la generación de ROS causada por daño funcional mitocondrial en el modelo celular de enfermedad de Parkinson de acuerdo con la concentración de etanol, la concentración de ROS intracelular se midió usando diacetato de 2',7'-diclorofluorosceína (DCF-DA).

35 Particularmente, BV2, la línea celular microglial de ratón, se inoculó en DMEM/F12 (1:1) complementado con FBS al 10 %, seguido de cultivo a una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %/ aire al (O<sub>2</sub>) 95 %. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 1 x 10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células se trataron con los diversos extractos mixtos en etanol de corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china que tenían diferentes proporciones de mezcla preparados en el ejemplo 5 usando diferentes concentraciones de etanol a la concentración de 1 µg/ml, seguido de cultivo durante 4 horas. Una vez completado el cultivo, se construyó el modelo celular de enfermedad de Parkinson de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <4-1>. Después, se cuantificó ROS basándose en la proporción de DCF-DA/bisbencimida de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <3-5>. El nivel de ROS, ya sea aumentado o disminuido, se comparó con el del control normal que no se trató con el

extracto o el componente activo del mismo, pero se trató con DMSO, y los resultados se presentaron como % mediante el control normal. El modelo celular de enfermedad de Parkinson de control negativo se construyó mediante el tratamiento de MPP+ 1 mM solo pero no se trató con el extracto o el componente activo del mismo. Después, el efecto de reducción de la generación de ROS se investigó de la misma manera que se describió anteriormente.

- 5 Como resultado, como se muestra en la tabla 30, la actividad mitocondrial reducida por 1-metil-4-fenilpiridinio se recuperó hasta un 106,06 % respecto al control normal después del tratamiento del extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1), que fue el más alto (tabla 30).

[Tabla 30]

Efecto de reducción de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1, p:p:p) de acuerdo con la concentración de etanol				
Tratamiento			Inductor (MPP+, mM)	DCF-DA-ROS (% del control)
Sustancia de tratamiento	Concentración de etanol %	de Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	-	100,00 ± 1,05
Control negativo	-	-	1,0	161,71 ± 1,88
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana (1:1:1; p:p:p)	10	1,0	1,0	111,22 ± 1,58
	30	1,0	1,0	110,67 ± 2,23
	50	1,0	1,0	108,27 ± 2,98
	70	1,0	1,0	108,75 ± 2,24
	90	1,0	1,0	105,06 ± 1,55

- 10 Ejemplo experimental 7 (no de acuerdo con la invención): Evaluación de la eficacia intracelular de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con los tipos de disolvente de extracción

<7-1> Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre actividad mitocondrial en el modelo celular de enfermedad de Parkinson de acuerdo con los tipos de disolvente de extracción

- 15 Para investigar el efecto de recuperación del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la actividad mitocondrial en el modelo celular de enfermedad de Parkinson de acuerdo con los tipos de disolvente de extracción, el índice de actividad mitocondrial se examinó en el modelo celular de enfermedad de Parkinson.

- 20 Particularmente, SH-SY5Y, la línea celular de neuroblastoma humano, se inoculó en DMEM/F12 (1:1) complementado con FBS al 10 %, seguido de cultivo a una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %/ aire al (O<sub>2</sub>) 95 %. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 1x10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células se trataron con los extractos mixtos en etanol de corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china (1:1:1) preparados en el ejemplo <5-1> usando diferentes concentraciones de etanol a la concentración de 1 µg/ml, seguido de cultivo durante 4 horas.
- 25 Una vez completado el cultivo, se construyó el modelo celular de enfermedad de Parkinson de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <4-1>. Después, la tasa de supervivencia celular se midió de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-1> usando calceína. La tasa de supervivencia celular que aumentó o disminuyó en comparación con la de las células de control normales no tratadas con el extracto o su componente activo anterior y en su lugar tratadas con DMSO se calculó y se presentó como porcentaje (%). El control negativo se trató con MPP+ 1 mM solo, dando como resultado la construcción del modelo celular de enfermedad de Parkinson
- 30 que no se había tratado con el extracto o el componente activo del mismo. Después, la tasa de supervivencia celular también se midió, ya sea aumentada o disminuida, comparándola con la del control normal, de la misma manera que se describió anteriormente.

- 35 Como resultado, como se muestra en la tabla 31, la actividad mitocondrial reducida por 1-metil-4-fenilpiridinio se recuperó hasta un 93,09 % respecto al control normal después del tratamiento del extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana, que fue la más alta (tabla 31).

[Tabla 31]

Efecto de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la tasa de supervivencia celular de acuerdo con los tipos de disolvente de extracción				
Tratamiento			Inductor (MPP+, mM)	Tasa de supervivencia celular (% del control)
Sustancia de tratamiento	Disolvente de extracción y conc. (%)	Conc. (µg/ ml)		
Control normal	-	-	-	100,00 ± 1,22
Control negativo	-	-	1,0	55,29 ± 1,06
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana (1:1:1; p:p:p)	Agua	1,0	1,0	87,80 ± 2,83
	Etanol al 90 %	1,0	1,0	93,09 ± 1,52
	Metanol al 90 %	1,0	1,0	87,15 ± 1,36
	Butanol al 90 %	1,0	1,0	89,76 ± 2,95

<7-2> Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la pérdida de ATP intracelular en el modelo celular de enfermedad de Parkinson de acuerdo con los tipos de disolvente de extracción

5 Para investigar el efecto de recuperación del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre el daño funcional mitocondrial en el modelo celular de enfermedad de Parkinson de acuerdo con los tipos de disolvente de extracción, se realizó un ensayo con ATP para confirmar el efecto de recuperación sobre la pérdida de ATP intracelular.

10 Particularmente, SH-SY5Y, la línea celular de neuroblastoma humano, se inoculó en DMEM/F12 (1:1) complementado con FBS al 10 %, seguido de cultivo a una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %/ aire al (O<sub>2</sub>) 95 %. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 1 x10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células se trataron con los extractos de mezcla de corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china (1:1:1) preparados en el ejemplo 5 usando diferentes disolventes de extracción a la concentración de 1 µg/ml, seguido de cultivo durante 4 horas. Una vez completado el cultivo, se construyó el modelo celular de enfermedad de Parkinson de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <4-1>. Después, el nivel de ATP intracelular se midió de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-3>. El nivel de ATP intracelular que aumentó o disminuyó en comparación con el de las células de control normales no tratadas con el extracto o su componente activo anterior y tratadas, en su lugar, con DMSO se calculó y se presentó como porcentaje (%). El control negativo se trató con MPP+ 1 mM solo, dando como resultado la construcción del modelo celular de enfermedad de Parkinson que no se había tratado con el extracto o el componente activo del mismo. Después, el efecto de recuperación sobre el nivel de ATP intracelular se investigó de la misma manera que se describió anteriormente.

20 Como resultado, como se muestra en la tabla 32, la actividad mitocondrial reducida por 1-metil-4-fenilpiridinio se recuperó hasta un 95,90 % respecto al control normal después del tratamiento del extracto mixto en etanol al 90 %, que fue la más alta (tabla 32).

25

[Tabla 32]

Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la pérdida de ATP intracelular de acuerdo con los tipos de disolvente de extracción				
Tratamiento			Inductor	ATP
Sustancia de tratamiento	Disolvente de extracción y conc. (%)	Conc. (µg/ ml)	(MPP+, mM)	intracelular (% del control)
Control normal	-	-	-	100,00 ± 1,78
Control negativo	-	-	1,0	54,10 ± 1,69
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana (1:1:1; p:p:p)	Agua	1,0	1,0	89,21 ± 2,34
	Etanol al 90 %	1,0	1,0	95,90 ± 3,64
	Metanol al 90 %	1,0	1,0	90,87 ± 1,86
	Butanol al 90 %	1,0	1,0	88,97 ± 1,78

<7-3> Reducción de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el modelo celular de enfermedad de

Parkinson por el extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con los tipos de disolvente de extracción

5 Para investigar el efecto de reducción del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la generación de ROS causada por el daño funcional mitocondrial en el modelo celular de enfermedad de Parkinson de acuerdo con los tipos de disolvente de extracción, la concentración de ROS intracelular se midió usando diacetato de 2',7'-diclorofluorosceína (DCF-DA).

10 Particularmente, BV2, la línea celular microglial de ratón, se inoculó en DMEM/F12 (1:1) complementado con FBS al 10 %, seguido de cultivo a una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %/ aire al (O<sub>2</sub>) 95 %. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 1 x 10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células se trataron con los extractos de mezcla de corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china preparados en el ejemplo 5 usando diferentes disolventes de extracción a la concentración de 1 µg/ml, seguido de cultivo durante 4 horas. Una vez completado el cultivo, se construyó el modelo celular de enfermedad de Parkinson de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <4-1>. Después, se cuantificó ROS basándose en la proporción de DCF-DA/bisbencimida de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <3-5>. El nivel de ROS, ya sea aumentado o disminuido, se comparó con el del control normal que no se trató con el extracto o el componente activo del mismo, pero se trató con DMSO, y los resultados se presentaron como % mediante el control normal. El modelo celular de enfermedad de Parkinson de control negativo se construyó mediante el tratamiento de MPP+ 1 mM solo pero no se trató con el extracto o el componente activo del mismo. Después, el efecto de reducción de la generación de ROS se investigó de la misma manera que se describió anteriormente.

20 Como resultado, como se muestra en la tabla 33, la actividad mitocondrial reducida por 1-metil-4-fenilpiridinio se recuperó hasta un 106,82 % respecto al control normal después del tratamiento del extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana, que fue la más alta (tabla 33).

[Tabla 33]

Efecto de reducción de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de acuerdo con los tipos de disolvente de extracción				
Tratamiento			Inductor (MPP+, mM)	DCF-DA-ROS (% del control)
Sustancia de tratamiento	Disolvente de extracción y conc. (%)	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-		100,00 ± 5,55
Control negativo	-	-	1,0	161,78 ± 7,06
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana (1:1:1; p:p:p)	Agua	1,0	1,0	112,71 ± 3,28
	Etanol al 90 %	1,0	1,0	106,82 ± 2,22
	Metanol al 90 %	1,0	1,0	110,45 ± 1,46
	Butanol al 90 %	1,0	1,0	109,47 ± 2,79

25 Ejemplo experimental 8: Evaluación de la eficacia intracelular de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana

<8-1> Mejora de la actividad mitocondrial mediante un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana

30 Para evaluar la eficacia intracelular del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención, los niveles de expresión de TFAM y H2AX, los marcadores representativos de la biogénesis de las mitocondrias, en células de neuroblastoma humano se midieron por transferencia de Western.

35 Particularmente, SH-SY5Y, la línea celular de neuroblastoma humano, se inoculó en DMEM/F12 (1:1) complementado con FBS al 10 %, seguido de cultivo a una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %/ aire al (O<sub>2</sub>) 95 %. Después, las células cultivadas se transfirieron a un medio libre de suero a la densidad de 1 x 10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células se trataron con un liofilizado del extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía y raíz de angélica china (1:1:1) preparado en el ejemplo <5-1> a la concentración de 1,0 µg/ml, seguido de cultivo durante 4 horas. Una vez completado el cultivo, se construyó el modelo celular de enfermedad de Parkinson de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <4-1>. Después, Las células pretratadas se trataron con MPP+ 0,5 mM, seguido de cultivo durante 24 horas para inducir el mal funcionamiento de las mitocondrias. Se obtuvo proteína intracelular de las células, seguida de transferencia de Western para investigar la fosforilación de la proteína STAT (S727 e Y705), la fosforilación de la proteína AKT (T308 y S473) y los niveles de expresión de las proteínas TH, TFAM y H2AX. Se usó β-actina como la proteína de control para la comparación de la expresión. El control normal no se trató con el extracto de la invención,

pero se trató con DMSO. El control negativo se trató con MPP+ 0,5 mM solo para causar daño mitocondrial y en este momento el control negativo no se trató con el extracto de la invención.

5 Como resultado, como se muestra en la tabla 34, cuando el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana preparado se trató a las células a la concentración de 1,0 µg/ml, la fosforilación de la proteína STAT (Y705), la fosforilación de la proteína AKT (T308 y S473) y los niveles de expresión de las proteínas TH, TFAM y H2AX se recuperaron casi al nivel normal (tabla 34).

[Tabla 34]

Niveles de expresión de proteínas de los genes relacionados con la actividad mitocondrial de acuerdo con el extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana			
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)	Inductor Conc. (MPP+, 0,5 mM)	<b>pSTAT(S727)/β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 2,04
Control negativo	-	30	95,24 ± 5,27
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana (1:1:1, p: p: p)	1	30	106,82 ± 2,98
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)	Inductor Conc. (MPP+, 0,5 mM)	<b>pSTAT(Y705)/β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 3,18
Control negativo	-	30	7,41 ± 0,91
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana (1:1:1, p:p:p)	1	30	42,54 ± 5,33
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)	Inductor Conc. (MPP+, 0,5 mM)	<b>STAT3/β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 2,86
Control negativo	-	30	101,27 ± 4,05
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana (1:1:1, p: p: p)	1	30	99,39 ± 2,02
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)	Inductor Conc. (MPP+, 0,5 mM)	<b>pAKT(T308)/β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 3,08
Control negativo	-	30	10,45 ± 0,82
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana (1:1:1, p: p: p)	1	30	98,42 ± 3,07
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)	Inductor Conc. (MPP+, 0,5 mM)	<b>pAKT(S473)/β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 2,10
Control negativo	-	30	8,13 ± 0,72
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana (1:1:1, p: p: p)	1	30	95,32 ± 3,09
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)	Inductor Conc. (MPP+, 0,5 mM)	<b>AKT1/β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 2,06

(continuación)

Niveles de expresión de proteínas de los genes relacionados con la actividad mitocondrial de acuerdo con el extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana			
Control negativo	-	30	96,21 ± 3,07
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana (1:1:1, p:p:p)	1	30	99,41 ± 2,02
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)	Inductor Conc. (MPP+, 0,5 mM)	<b>TH/β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 3,06
Control negativo	-	30	9,28 ± 1,01
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana (1:1:1, p:p:p)	1	30	97,38 ± 4,37
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)	Inductor Conc. (MPP+, 0,5 mM)	<b>TFAM/β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 2,97
Control negativo	-	30	15,83 ± 2,12
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana (1:1:1, p:p:p)	1	30	97,21 ± 3,05
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)	Inductor Conc. (MPP+, 0,5 mM)	<b>H2AX/β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 3,07
Control negativo	-	30	4,11 ± 0,72
Corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana (1:1:1, p:p:p)	1	30	89,32 ± 2,73

<8-2> Expresión del gen marcador de estrés del retículo endoplasmático de acuerdo con el extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana

5 Para investigar el efecto del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención sobre la recuperación del estrés del retículo endoplasmático, se midieron los niveles de expresión de los genes marcadores de estrés del retículo endoplasmático, *GRP78* y *XBP1p*.

10 Particularmente, se cultivaron células SH-SY5Y de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <2-2> y se indujo estrés del retículo endoplasmático. Después, Se realizó RT-PCR con las células que tenían estrés del retículo endoplasmático de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <1-4>, seguida de electroforesis para investigar los niveles de expresión de los genes *GRP78* y *XBP1p* en gel de agarosa al 1,5 % bajo UV. El control normal no se trató con el extracto de la invención, pero se trató con DMSO solo. El control negativo no se trató con el extracto o el componente activo, sino que se trató con 0,5 (µg/ml) de tapsigargina sola para inducir estrés del retículo endoplasmático. Después, La expresión del gen marcador de estrés del retículo endoplasmático se confirmó de la misma manera que se describió anteriormente.

15 Como resultado, como se muestra en la tabla 35 y la tabla 36, los niveles de expresión de los genes marcadores de estrés del retículo endoplasmático *GRP78* y *XBP1p* se recuperaron al nivel normal en las células que presentaban estrés del retículo endoplasmático inducido por el tratamiento del extracto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana a la concentración de 1,0 (µg/ml) (tablas 35 y 36).

[Tabla 35]

Expresión de ARNm de <i>GRP78</i> de acuerdo con el extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en células que tienen estrés del retículo endoplasmático inducido por tapsigargina			
Tratamiento	Conc. (µg/ml)	Inductor (tapsigargina, µg/ml)	<i>GRP78</i> /ARNm 18S
Control normal	-	-	2,01 ± 0,04

(continuación)

Expresión de ARNm de <i>GRP78</i> de acuerdo con el extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en células que tienen estrés del retículo endoplasmático inducido por tapsigargina			
Tratamiento		Inductor (tapsigargina, <i>GRP78</i> /ARNm 18S)	
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)	(µg/ml)	
Control negativo	-	0,5	100,0 ± 3,05
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china +1 raíz de hierba gitana		0,5	3,12 ± 0,02

[Tabla 36]

Expresión de ARNm de <i>XBP1p</i> de acuerdo con el extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en células que tienen estrés del retículo endoplasmático inducido por tapsigargina			
Tratamiento		Inductor (tapsigargina, <i>XBP1P</i> /ARNm 18S)	
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)	(µg/ml)	
Control normal	-	-	3,46 ± 0,03
Control negativo	-	0,5	100,0 ± 2,79
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china +1 raíz de hierba gitana		0,5	2,98 ± 0,01

<8-3> Efecto antiinflamatorio y efecto antioxidante de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana

5 Para investigar el efecto de recuperación del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención sobre la respuesta inflamatoria, se realizó el procedimiento de Griess para medir la concentración de nitrito/nitrato (NO<sub>x</sub>) en el medio de cultivo celular y la concentración de ROS intracelular usando diacetato de 2',7'-diclorofluorosceína (DCF-DA).

10 Particularmente, se cultivaron células BV2 de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <3-1> y se indujo una respuesta inflamatoria. Después, se obtuvieron 100 µl del medio de cultivo celular, a los que se añadieron 100 µl de reactivos de Griess que comprendía ácido clorhídrico que contenía sulfanilamida al 5 % y naftiletildiamina al 2 %, seguido de reacción en una sala oscura durante 30 minutos. Una vez completada la reacción, se midió la DO<sub>540</sub> con un lector de microplacas EISA (Versamax, EE. UU.). La concentración de óxido nítrico en el medio se calculó usando la curva de calibración estándar de nitrito de sodio. Para medir la concentración de ROS, las células se trataron con DCF-DA 1 µM y bisbencimida 0,05 µM (Hoechst 33342), seguido por tinción a 37 °C durante 1 hora. Después de la tinción, se midió la intensidad de fluorescencia de DCF-DA a 485 nm/535 nm, y se midió la intensidad de fluorescencia de bisbencimida a 335 nm/460 nm. Basándose en la proporción de DCF-DA/bisbencimida, se cuantificó ROS. La cantidad de ROS, ya sea aumentada o disminuida, se comparó con la del control normal que no se trató con el extracto pero se trató con DMSO, y los resultados se presentaron como %. El control negativo se trató con 100 ng/ml de LPS solo para inducir una respuesta inflamatoria pero no se trató con el extracto o el componente activo del mismo. Después, el efecto de reducción de la concentración de óxido nítrico y el efecto de reducción de la concentración de ROS se investigaron de la misma manera que se describió anteriormente.

25 Como resultado, como se muestra en la tabla 37, se confirmó que el extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención tiene el efecto de reducir la generación de NO mediada por LPS (tabla 37) y el efecto de reducir la generación de ROS mediada por DCF-DA causada por la respuesta inflamatoria y el estrés (tabla 38).

[Tabla 37]

Efecto de reducción de la concentración de óxido nítrico (NO) de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana			
Tratamiento		Inductor (LPS, ng/ml)	NO (mM)
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	46,79 ± 3,45



(continuación)

Efecto de reducción de la concentración de óxido nítrico (NO) de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana			
Tratamiento		Inductor (LPS, ng/ml)	NO (mM)
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)		
Control negativo	-	100	200,32 ± 10,24
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	100	42,67 ± 2,09

[Tabla 38]

Efecto de reducción de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana			
Tratamiento		Inductor (LPS, ng/ml)	DCF-DA-ROS (% del control)
Sustancia de tratamiento	Conc. (µg/ml)		
Control normal	-	-	100,24 ± 6,79
Control negativo	-	100	134,09 ± 19,13
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	100	115,83 ± 8,09

Ejemplo experimental 9: Efecto de terapéutico de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la enfermedad de Parkinson *in vivo*

5 <9-1> Construcción del modelo animal de enfermedad de Parkinson: Modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP

Como se muestra en la figura 1, el modelo animal de enfermedad de Parkinson se construyó para investigar el efecto terapéutico *in vivo* del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención sobre la enfermedad de Parkinson (figura 1).

10 Particularmente, se distribuyeron ratones macho C57BL/6 de 5 semanas de edad (peso: aproximadamente 19 ~ 22 g), seguido de adaptación en un laboratorio de animales de la División de Investigación de Dong-A ST durante al menos 1 semana. En este momento, la temperatura interior se reguló a 22 ± 2 °C y la humedad se controló al 53 ± 3 %.

15 El ciclo de luz y oscuridad se fijó a 12 h/12 h. El agua y los alimentos se proporcionaron libremente. Después de la adaptación, los ratones se agruparon en 5 grupos y a cada grupo se le asignaron 6 ratones. El liofilizado del extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1) preparado en el ejemplo <5-1> se disolvió en HPMC al 3 %, que se administró por vía oral (por vía oral, v.o.) a los ratones a la

20 dosis de 1, 3 y 10 µg/kg una vez al día durante 14 días. Después, a los ratones se les administró (intraperitoneal, i.p.) con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) a la dosis de 30 µg/kg 3 horas después de la administración oral durante 5 días desde el 8° día del experimento, dando como resultado la construcción del modelo animal de enfermedad de Parkinson. Al control normal se le administró HPMC al 3 % a la dosis de 5 ml/kg sin el extracto de la mezcla, y después se le administró por vía intraperitoneal PBS sin MPTP.

<9-2> Mejora de la coordinación motora en el modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP por el extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana

25 Para investigar el efecto de terapéutico *in vivo* del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención sobre la enfermedad de Parkinson, se realizó un ensayo de comportamiento (test del mástil, test de Rotarod) con el modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP después de la administración del extracto de la mezcla anterior.

30 Particularmente, se construyó el modelo en ratón de enfermedad de Parkinson en el ejemplo experimental <8-1>. El modelo animal, 14 días después de la construcción, se colocó en la parte superior del poste con la superficie rugosa (diámetro: 8 mm, altura: 55 cm). El tiempo para que el ratón bajara completamente se midió cada 30 segundos, que se definió como el tiempo para dar la vuelta (T-vuelta), y se midió el tiempo para que el ratón llegara al suelo, que se definió como el tiempo de actividad de locomoción (T-AL). El animal se colocó en la rueda cuyas rpm podían ser reguladas. Se midió el tiempo para que el animal se cayera (latencia a la caída). El control normal se trató con el vehículo de HPMC al 3 %. Al control negativo se le administró por vía intraperitoneal (i.p.) MPTP a la dosis de 30 µg/kg durante 5 días, pero no se trató con el extracto de la mezcla posteriormente. Después, se realizó la prueba del mástil con los controles para medir el T-vuelta y el T-AL y se realizó la prueba de Rotarod para medir la latencia a la caída de la misma manera que se describió anteriormente.

35

5 Como resultado, como se muestra en la tabla 39 y la tabla 40, en comparación con el grupo de control normal tratado con el vehículo, el T-vuelta y el T-AL aumentaron significativamente en el control negativo tratado con MPTP solo. Mientras tanto, en el modelo en ratón de enfermedad de Parkinson tratado con el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana, T-vuelta y T-AL se redujeron (tabla 39 y tabla 40). Como se muestra en la tabla 41, se confirmó a partir del test de Rotarod que la latencia a la caída se redujo significativamente en el control negativo tratado con MPTP solo, mientras que la latencia a la caída aumentó en el modelo en ratón con enfermedad de Parkinson tratado con el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana. Por lo tanto, se confirmó que la coordinación motora se recuperó en el modelo en ratón de enfermedad de Parkinson mediante el tratamiento del extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (tablas 39 ~ 41).

[Tabla 39]

Disminución de T-vuelta por extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP			
Tratamiento		Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	T-vuelta (s)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg*)		
Control normal	-	-	1,96 ± 0,17
Control negativo	-	30	4,79 ± 0,41
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	4,06 ± 0,36
	3	30	3,74 ± 0,42
	10	30	2,84 ± 0,19
* La dosis representa la masa (mg) del extracto de la mezcla tratada por kg de peso corporal del ratón del modelo animal			

[Tabla 40]

Disminución de T-AL por extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP			
Tratamiento		Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	T-vuelta (s)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg*)		
Control normal	-	-	4,63 ± 0,37
Control negativo	-	30	8,27 ± 0,18
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	7,93 ± 0,63
	3	30	7,27 ± 0,27
	10	30	6,43 ± 0,44
* La dosis representa la masa (mg) del extracto de la mezcla tratada por kg de peso corporal del ratón del modelo animal			

[Tabla 41]

Disminución de la latencia a la caída por extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP			
Tratamiento		Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	Latencia a la caída (s)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg*)		
Control normal	-	-	211,03 ± 4,69
Control negativo	-	30	99,87 ± 32,47

(continuación)

Disminución de la latencia a la caída por extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP			
Tratamiento		Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	Latencia a la caída (s)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg*)		
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	153,34 ± 27,13
	3	30	187,06 ± 24,94
	10	30	181,76 ± 19,81
* La dosis representa la masa (mg) del extracto de la mezcla tratada por kg de peso corporal del ratón del modelo animal			

<9-3> Efecto protector de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre neuronas dopaminérgicas *in vivo*

Para investigar el efecto de terapéutico *in vivo* del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención sobre la enfermedad de Parkinson, se obtuvo el tejido cerebral del modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP tratado con el extracto de la mezcla de la invención, con lo que se confirmó el efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas en el estriado (ST) y la sustancia negra (SN).

Particularmente, al modelo en ratón que terminó con el ensayo de comportamiento en el ejemplo experimental <8-2> se le administró zoletil (50 mg/kg) mediante inyección intramuscular para anestesia. Se perfundió PBS que contenía paraformaldehído al 4 % a través del corazón y después se extrajo el cerebro. El cerebro extraído se fijó una vez más en paraformaldehído al 4 % y después se sumergió en solución de sacarosa al 30 % a 4 °C hasta que el cerebro se hundió, que después se congeló. El tejido cerebral congelado se cortó en secciones coronales de 30 µm usando un microtomo de criostato (Nombre del producto: CM3000, Leica, Alemania), y las secciones se almacenaron en una solución madre que contenía glicerina, etilenglicol y PBS a 4 °C. Las secciones se colocaron en un cubreobjetos y se lavaron con PBS, seguido de un tratamiento con PBS que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1 % durante 15 minutos para eliminar la actividad peroxidasa del tejido. Después, se les trató con anticuerpo anti-tirosina hidroxilasa (anti-TH; 1:2000, originario de conejo; Millipore, EE. UU.) como el anticuerpo primario, seguido de reacción durante una noche. Se les trató con anticuerpo anti-IgG de conejo biotinilado como anticuerpo secundario, seguido de reacción a temperatura ambiente durante 90 minutos. Una vez completada la reacción, el tejido se trató con una solución de complejo de avidina y biotina incluida en el kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, EE. UU.), seguido de reacción durante 1 hora. El desarrollo del color se indujo usando diaminobencidina. Para investigar el efecto protector de células de la dopamina, se midió la densidad óptica del estriado (ST) y después se contaron las células positivas para tirosina hidroxilasa (TH) en la sustancia negra (SN). El grupo de control normal se trató con un disolvente y al control negativo se le administró por vía intraperitoneal (i.p.) MPTP a la dosis de 30 mg/kg durante 5 días, pero no se trató con el extracto de la mezcla posteriormente.

Como resultado, como se muestra en la tabla 42, la densidad óptica de la TH teñida en el estriado (ST) del modelo animal de enfermedad de Parkinson administrado con el extracto en etanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana se incrementó de manera dependiente de la dosis, sugiriendo que el extracto tenía el efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas. Como se muestra en la tabla 43, las células positivas para TH en la sustancia negra también aumentaron de acuerdo con la administración del extracto en etanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana, de manera dependiente de la dosis (tablas 42 y 43).

[Tabla 42]

Aumento de la densidad óptica de TH en el estriado (ST) por extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP			
Tratamiento		Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	Densidad óptica (% del control)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg*)		
Control normal	-	-	100,00 ± 4,33
Control negativo	-	30	43,48 ± 4,02

(continuación)

Aumento de la densidad óptica de TH en el estriado (ST) por extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP			
Tratamiento		Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	Densidad óptica (% del control)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg*)		
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	52,70 ± 2,39
	3	30	66,45 ± 5,23
	10	30	72,00 ± 4,21
* La dosis representa la masa (mg) del extracto de la mezcla tratada por kg de peso corporal del ratón del modelo animal			

[Tabla 43]

Aumento de células positivas para TH en la sustancia negra (SN) por extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP			
Tratamiento		Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	Célula positiva para TH (% del control)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg*)		
Control normal	-	-	100,00 ± 2,99
Control negativo	-	30	52,83 ± 6,42
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	62,27 ± 2,78
	3	30	73,20 ± 3,93
	10	30	85,14 ± 4,69
* La dosis representa la masa (mg) del extracto de la mezcla tratada por kg de peso corporal del ratón del modelo animal			

**<9-4> Efecto de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la cantidad de dopamina *in vivo***

5 Para investigar el efecto de terapéutico *in vivo* del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención sobre la enfermedad de Parkinson, se obtuvo el tejido cerebral del modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP tratado con el extracto de la mezcla de la invención y se midió el nivel de dopamina en su interior.

10 Particularmente, el cerebro se extrajo del ratón que terminó con el ensayo de comportamiento en el ejemplo experimental <8-2>. El ST se separó del cerebro extraído, seguido de homogeneización. Se le añadió ácido perclórico (Sigma), seguido de cultivo. El ST cultivado se filtró y se presurizó/concentró. El extracto concentrado procedió a cromatografía para medir el nivel de dopamina. El grupo de control normal se trató con un disolvente y al control negativo se le administró por vía intraperitoneal (i.p.) MPTP a la dosis de 30 mg/kg durante 5 días, pero no se trató con el extracto de la mezcla posteriormente.

15 Como resultado, como se muestra en la tabla 44, el nivel de dopamina se redujo significativamente en el modelo animal de enfermedad de Parkinson no tratado con el extracto en etanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana, pero el nivel de dopamina aumentó significativamente cuando el extracto en etanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana se administró al animal (tabla 44).

[Tabla 44]

Efecto de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la cantidad de dopamina en el modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP			
Tratamiento		Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	Contenido de dopamina (% del control)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg*)		
Control normal	-	-	100,02 ± 7,69
Control negativo	-	30	34,16 ± 4,77

20

(continuación)

Efecto de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la cantidad de dopamina en el modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP			
Tratamiento		Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	Contenido de dopamina (% del control)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg*)		
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	49,87 ± 3,86
	3	30	53,77 ± 2,09
	10	30	57,02 ± 2,76
* La dosis representa la masa (mg) del extracto de la mezcla tratada por kg de peso corporal del ratón del modelo animal			

<9-5> Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre el daño de TH, mitocondrias y el sistema de señalización de insulina *in vivo*

5 Para investigar el efecto de terapéutico *in vivo* del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención sobre la enfermedad de Parkinson, se obtuvo el tejido cerebral del modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP tratado con el extracto de la mezcla de la invención y los niveles de expresión de TH y ND9, el marcador mitocondrial y el nivel de fosforilación de Akt1, el marcador del sistema de señalización de insulina, se midieron.

10 Particularmente, las secciones de sustancia negra (SN), cuerpo estriado (ST) y cerebelo se obtuvieron de la misma manera que se describe en el ejemplo experimental <8-3>, a partir de las cuales se obtuvo la proteína del tejido cerebral. La transferencia de Western se realizó con la proteína para medir los niveles de expresión de TH y ND9 y el nivel de fosforilación de Akt1 (S473 y T308). En este momento, se usó  $\beta$ -actina como la proteína de control para la comparación de la expresión. El grupo de control normal se trató con un disolvente y al control negativo se le administró por vía intraperitoneal (i.p.) MPTP a la dosis de 30 mg/kg durante 5 días, pero no se trató con el extracto de la mezcla posteriormente.

15 Como resultado, como se muestra en las Tablas 45 ~ 47, los niveles de expresión de TH y ND9 en SN, ST y cerebelo del modelo animal administrado con el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana a la dosis de 10 mg/kg se recuperaron casi al nivel normal tan alto como el del control normal, y el nivel de fosforilación de la proteína Akt1 también se recuperó al nivel normal (tablas 45 ~ 47).

[Tabla 45]

Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre el daño de TH, mitocondrias y el sistema de señalización de insulina en SN de modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP			
Tratamiento		Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	<b>pAkt(T308)/<math>\beta</math>-actina</b>
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)		
Control normal	-	-	100,00 ± 1,31
Control negativo	-	30	5,65 ± 0,97
Extracto de mezcla	1	30	67,43 ± 4,62
	3	30	71,07 ± 3,99
1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	10	30	79,03 ± 3,12
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)	Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	<b>pAkt(S473)/<math>\beta</math>-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 1,82
Control negativo	-	30	2,90 ± 0,37
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	72,74 ± 6,81
	3	30	83,62 ± 2,95
	10	30	87,78 ± 4,12

20

(continuación)

Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre el daño de TH, mitocondrias y el sistema de señalización de insulina en SN de modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP			
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)	Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	<b>Akt/β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 2,95
Control negativo	-	30	101,94 ± 1,17
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	103,71 ± 3,95
	3	30	97,34 ± 2,60
	10	30	97,82 ± 3,78
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)	Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	<b>TH1β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 1,25
Control negativo	-	30	3,79 ± 0,06
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	76,62 ± 5,65
	3	30	88,76 ± 5,57
	10	30	80,27 ± 4,96
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)	Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	<b>ND9/β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 2,81
Control negativo	-	30	6,17 ± 0,57
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	83,42 ± 2,53
	3	30	86,03 ± 2,78
	10	30	87,71 ± 3,76

[Tabla 46]

Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre el daño de TH, mitocondrias y el sistema de señalización de insulina en ST de modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP			
Tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)	Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	<b>pAkt(T308)/β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 3,73
Control negativo	-	30	8,82 ± 0,41
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	76,83 ± 3,96
	3	30	88,86 ± 4,94
	10	30	82,53 ± 7,71
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)	Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	<b>pAkt(S473)/β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 3,97
Control negativo	-	30	6,05 ± 1,03
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	72,53 ± 5,71
	3	30	86,77 ± 2,65
	10	30	96,18 ± 6,11
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)	Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	<b>AktIβ-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 2,11
Control negativo	-	30	101,34 ± 4,14

(continuación)

Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre el daño de TH, mitocondrias y el sistema de señalización de insulina en ST de modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP			
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	96,35 ± 6,44
	3	30	104,85 ± 2,24
	10	30	103,51 ± 3,91
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)	Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	<b>TH1β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 2,61
Control negativo	-	30	5,41 ± 1,72
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	87,02 ± 5,97
	3	30	93,53 ± 2,59
	10	30	92,79 ± 5,41
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)	Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	<b>ND9/β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 4,88
Control negativo	-	30	5,03 ± 0,74
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	79,33 ± 1,18
	3	30	8 6,85+ 2,63
	10	30	92,31 ± 3,68

[Tabla 47]

Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre el daño de TH, mitocondrias y el sistema de señalización de insulina en cerebelo de modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP			
Tratamiento		Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	<b>pAkt(T308)β-actina</b>
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)		
Control normal	-	-	100,00 ± 3,73
Control negativo	-	30	8,82 ± 0,41
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	76,83 ± 3,96
	3	30	88,86 ± 4,94
	10	30	82,53 ± 7,71
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)	Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	<b>pAkt(S473)β-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 3,97
Control negativo	-	30	6,05 ± 1,03
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	72,53 ± 5,71
	3	30	86,77 ± 2,65
	10	30	96,18 ± 6,11
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)	Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	<b>Aktβ-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 ± 2,11
Control negativo	-	30	101,34 ± 4,14
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	96,35 ± 6,44
	3	30	104,85 ± 2,24
	10	30	103,51 ± 3,91

(continuación)

Efecto de recuperación de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre el daño de TH, mitocondrias y el sistema de señalización de insulina en cerebelo de modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por MPTP			
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)	Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	<b>TH<math>\beta</math>-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 $\pm$ 2,61
Control negativo	-	30	5,41 $\pm$ 1,72
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	87,02 $\pm$ 5,97
	3	30	93,53 $\pm$ 2,59
	10	30	92,79 $\pm$ 5,41
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)	Dosis de inductor (MPTP, mg/kg 5x, ip)	<b>ND9/<math>\beta</math>-actina</b>
Control normal	-	-	100,00 $\pm$ 4,88
Control negativo	-	30	5,03 $\pm$ 0,74
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	1	30	79,33 $\pm$ 1,18
	3	30	86,85 $\pm$ 2,63
	10	30	92,31 $\pm$ 3,68

Ejemplo experimental 10: Efecto de terapéutico de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la enfermedad de Parkinson *in vivo*

<10-1> Construcción del modelo animal de enfermedad de Parkinson: modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por 6-OHDA(6-hidroxidopamina)

- 5 Para investigar el efecto de terapéutico *in vivo* del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención sobre la enfermedad de Parkinson, se construyó el modelo animal de enfermedad de Parkinson como se muestra en la figura 2 (figura 2).

10 Particularmente, se distribuyeron ratones macho ICR de 8 semanas de edad (peso: aproximadamente 19 ~ 22 g), seguido de adaptación en un laboratorio de animales del Kyung Hee University College of Pharmacy durante al menos 1 semana. En este momento, la temperatura interior se reguló a 22  $\pm$  2 °C y la humedad se controló al 53  $\pm$  3 %. El ciclo de luz y oscuridad se fijó a 12 h/12 h. El agua y los alimentos se proporcionaron libremente. Después de la adaptación, los ratones se agruparon en 3 grupos y a cada grupo se le asignaron 6 ratones. Se diluyeron 16  $\mu$ g de 6-OHDA (6-hidroxidopamina) en 2  $\mu$ l de ácido ascórbico al 0,1 %, que se inyectó en cada ratón mediante cirugía estereotáctica, dando como resultado la construcción del modelo animal de enfermedad de Parkinson. El liofilizado del extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1) preparado en el ejemplo <5-1> se disolvió en agua, que se administró por vía oral (por vía oral, v.o.) a los ratones a la dosis de 3  $\mu$ g/kg una vez al día durante 7 días. El grupo de control normal se trató con un disolvente y al control negativo se le inyectó ácido ascórbico al 0,1 % que contenía 6-OHDA mediante cirugía estereotáctica.

20 <10-2> Mejora de la coordinación motora mediante un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por 6-OHDA

Para investigar el efecto de terapéutico *in vivo* del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención sobre la enfermedad de Parkinson, se realizó un ensayo de comportamiento (test del mástil, test de Rotarod) con el modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por 6-OHDA después de la administración del extracto de la mezcla anterior.

25 Particularmente, se construyó el modelo en ratón de enfermedad de Parkinson en el ejemplo experimental <9-1>. El modelo animal, 7 días después de la construcción, se colocó en la parte superior del poste con la superficie rugosa (diámetro: 8 mm, altura: 55 cm). El tiempo para que el ratón bajara completamente se midió cada 30 segundos, que se definió como el tiempo para dar la vuelta (T-vuelta), y se midió el tiempo para que el ratón llegara al suelo, que se definió como el tiempo de actividad de locomoción (T-AL). El animal se colocó en la rueda cuyas rpm podían ser reguladas. Se midió el tiempo para que el animal se cayera (latencia a la caída). El grupo de control normal se trató con un disolvente y al control negativo se le inyectó ácido ascórbico al 0,1 % que contenía 6-OHDA mediante cirugía estereotáctica. Después, se realizó la prueba del mástil con los controles para medir el T-vuelta y el T-AL y se realizó la prueba de Rotarod para medir la latencia a la caída de la misma manera que se describió anteriormente.

35 Como resultado, como se muestra en la tabla 48 y la tabla 49, en comparación con el grupo de control normal tratado con un disolvente, el T-vuelta y el T-AL aumentaron significativamente en el grupo de control negativo tratado con 6-OHDA sola. Mientras tanto, en el modelo en ratón de enfermedad de Parkinson tratado con el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana, T-vuelta y T-AL se redujeron (tabla



48 y tabla 49). Como se muestra en la tabla 50, se confirmó a partir del test de Rotarod que la latencia a la caída se redujo significativamente en el control negativo tratado con 6-OHDA sola, mientras que la latencia a la caída aumentó en el modelo en ratón con enfermedad de Parkinson tratado con el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana. Por lo tanto, se confirmó que la coordinación motora se recuperó en el modelo en ratón de enfermedad de Parkinson mediante el tratamiento del extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (tablas 48 ~ 50).

[Tabla 48]

Disminución de T-vuelta por extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por 6-OHDA			
Tratamiento		Dosis de inductor (6-OHDA, µg)	T-vuelta (s)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)		
Control normal	-	-	3,75 ± 0,76
Control negativo	-	16	15,64 ± 4,01
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	3	16	4,71 ± 1,65

[Tabla 49]

Disminución de T-AL por extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por 6-OHDA			
Tratamiento		Dosis de inductor (6-OHDA, mg)	T-AL (s)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)		
Control normal	-	-	9,54 ± 1,67
Control negativo	-	16	17,24 ± 7,01
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	3	16	7,87 ± 3,08

[Tabla 50]

Disminución de la latencia a la caída por extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por 6-OHDA			
Tratamiento		Dosis de inductor (6-OHDA, µg)	Latencia a la caída (s)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)		
Control normal	-	-	46,08 ± 19,24
Control negativo	-	16	3,11 ± 0,38
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	3	16	17,20 ± 3,19

10 <10-3> Efecto protector de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre neuronas dopaminérgicas *in vivo*

15 Para investigar el efecto de terapéutico *in vivo* del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención sobre la enfermedad de Parkinson, se obtuvo el tejido cerebral del modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por 6-OHDA tratado con el extracto de la mezcla de la invención, con lo que se confirmó el efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas en el estriado (ST) y la sustancia negra (SN).

20 Particularmente, al modelo en ratón que terminó con el ensayo de comportamiento en el ejemplo experimental <9-2> se le administró zoletil (50 mg/kg) mediante inyección intramuscular para anestesia. Se perfundió PBS que contenía paraformaldehído al 4 % a través del corazón y después se extrajo el cerebro. El cerebro extraído se fijó una vez más en paraformaldehído al 4 % y después se sumergió en solución de sacarosa al 30 % a 4 °C hasta que el cerebro se hundió, que después se congeló. El tejido cerebral congelado se cortó en secciones coronales de 30 µm usando un microtomo de criostato (Nombre del producto: CM3000, Leica, Alemania), y las secciones se almacenaron en una solución madre que contenía glicerina, etilenglicol y PBS a 4 °C. Las secciones se colocaron en un cubreobjetos y se lavaron con PBS, seguido de un tratamiento con PBS que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1 % durante 15 minutos para eliminar la

- 5 actividad peroxidasa del tejido. Después, se les trató con anticuerpo anti-tirosina hidroxilasa (anti-TH; 1:2000, originario de conejo; Millipore, EE. UU.) como el anticuerpo primario, seguido de reacción durante una noche. Se les trató con anticuerpo anti-IgG de conejo biotinilado como anticuerpo secundario, seguido de reacción a temperatura ambiente durante 90 minutos. Una vez completada la reacción, el tejido se trató con una solución de complejo de avidina y biotina incluida en el kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, EE. UU.), seguido de reacción durante 1 hora. El desarrollo del color se indujo usando diaminobencidina. Para investigar el efecto protector de células de la dopamina, se midió la densidad óptica del estriado (ST) y después se contaron las células positivas para tirosina hidroxilasa (TH) en la sustancia negra (SN). El grupo de control normal se trató con un disolvente y al control negativo se le inyectó ácido ascórbico al 0,1 % que contenía 6-OHDA mediante cirugía estereotáctica.
- 10 Como resultado, como se muestra en la tabla 51 y la tabla 52, la densidad óptica de la TH teñida en el estriado (ST) del modelo animal de enfermedad de Parkinson administrado con el extracto en etanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana se incrementó de manera dependiente de la dosis, sugiriendo que el extracto tenía el efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas. Las células positivas para TH en la sustancia negra también aumentaron de acuerdo con la administración del extracto en etanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana, de manera dependiente de la dosis (tablas 51 y 52).

[Tabla 51]

Aumento de la densidad óptica de TH en el estriado (ST) por extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por 6-OHDA			
Tratamiento		Dosis de inductor (6-OHDA, µg)	Densidad óptica (% del control)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)		
Control normal	-	-	100,01 ± 6,58
Control negativo	-	16	58,46 ± 4,09
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	3	16	76,84 ± 5,37

[Tabla 52]

Aumento de células positivas para TH en la sustancia negra (SN) por extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana en modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por 6-OHDA			
Tratamiento		Dosis de inductor (6-OHDA, µg)	Célula positiva para TH (% del control)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)		
Control normal	-	-	100,00 ± 7,94
Control negativo	-	16	63,67 ± 3,08
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	3	16	76,90 ± 2,18

Ejemplo experimental 11: Efecto de terapéutico de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la enfermedad de Parkinson *in vivo*

- 20 <11-1> Construcción del modelo animal de enfermedad de Parkinson: modelo en rata de enfermedad de Parkinson inducida por rotenona
- Para investigar el efecto de terapéutico *in vivo* del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención sobre la enfermedad de Parkinson, se construyó el modelo animal de enfermedad de Parkinson como se muestra en la figura 3 (figura 3).
- 25 Particularmente, se distribuyeron ratas macho SD de 7 semanas de edad (peso: 200 ~ 220 g), seguido de adaptación en un laboratorio de animales de la División de Investigación de Dong-A ST durante al menos 1 semana. En este momento, la temperatura interior se reguló a 22 ± 2 °C y la humedad se controló al 53 ± 3 %. El ciclo de luz y oscuridad se fijó a 12 h/12 h. El agua y los alimentos se proporcionaron libremente. Después de la adaptación, las ratas se agruparon en 3 grupos y a cada grupo se le asignaron 6 ratas. El liofilizado del extracto mixto en etanol al 90 % de
- 30 corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1) preparado en el ejemplo <5-1> se disolvió en agua, que se administró por vía oral (por vía oral, v.o.) a las ratas a la dosis de 10 mg/kg una vez al día durante 6 semanas. Después, a las ratas se les administró (intraperitoneal, i.p.) rotenona a la dosis de 2,5 mg/kg, 1 semana después de la administración oral una vez al día durante 5 semanas, dando como resultado la construcción del modelo animal de enfermedad de Parkinson. El grupo de control normal se trató con un disolvente y al control

negativo se le administró (intraperitoneal (i.p.) rotenona a la dosis de 2,5 mg/kg una vez al día durante 5 semanas.

<11-2> Mejora de la coordinación motora en el modelo en rata de enfermedad de Parkinson inducida por rotenona por el extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana

5 Para investigar el efecto de terapéutico *in vivo* del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención sobre la enfermedad de Parkinson, se realizó un ensayo de comportamiento (test del cilindro) con el modelo en rata de enfermedad de Parkinson inducida por rotenona después de la administración del extracto de la mezcla anterior.

10 Particularmente, el test del cilindro se realizó con el modelo en rata de enfermedad de Parkinson construido en el ejemplo experimental <11-1>. Las ratas se colocaron en un cilindro (altura: 30 cm, diámetro: 20 cm). Se contó cuántas veces la rata levantó el cuerpo y colocó las patas contra la pared durante 5 minutos. El grupo de control normal se trató con un disolvente y al control negativo se le administró por vía intraperitoneal rotenona a la dosis de 2,5 mg/kg una vez al día durante 5 semanas. Igualmente, se contó con los controles cuántas veces la rata levantó el cuerpo y colocó las patas contra la pared durante 5 minutos.

15 Como resultado, como se muestra en la tabla 53, la cantidad de puestas en posición erguida del grupo de control negativo administrado con rotenona sola se redujo significativamente, en comparación con la del grupo de control normal tratado con un disolvente solo, que aumentó cuando se administró el extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (Tabla 53).

[Tabla 53]

Efecto de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre el número de veces que las patas se colocan contra la pared durante 5 minutos en modelo en rata de enfermedad de Parkinson inducida por rotenona			
Tratamiento		Dosis de inductor (Rotenona, mg/kg)	Nº. de veces que se yergue por 5 min
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)		
Control normal	-	-	13,75 ± 2,14
Control negativo	-	2,5	2,19 ± 0,49
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	10	2,5	6,05 ± 1,85

20 <11-3> Disminución de la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína mediante un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana

Para investigar el efecto de terapéutico *in vivo* del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención sobre la enfermedad de Parkinson, los tejidos cerebrales se obtuvieron del modelo en rata de enfermedad de Parkinson inducida por rotenona tratado con el extracto de mezcla. Se investigó el patrón de acumulación de oligómero de  $\alpha$ -sinucleína en la sustancia negra (SN) del tejido cerebral.

25 Particularmente, al modelo en rata que terminó con el ensayo de comportamiento en el ejemplo experimental <11-2> se le administró zoletil (50 mg/kg) mediante inyección intramuscular para anestesia. Se perfundió PBS que contenía paraformaldehído al 4 % a través del corazón y después se extrajo el cerebro. El cerebro extraído se fijó una vez más en paraformaldehído al 4 % y después se sumergió en solución de sacarosa al 30 % a 4 °C hasta que el cerebro se hundió, que después se congeló. El tejido cerebral congelado se cortó en secciones coronales de 30  $\mu$ m usando un microtomo de criostato (Nombre del producto: CM3000, Leica, Alemania), y las secciones se almacenaron en glicerina, etilenglicol y PBS a 4 °C. Las secciones se colocaron en un cubreobjetos y se lavaron con PBS, seguido de un tratamiento con PBS que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1 % durante 15 minutos para eliminar la actividad peroxidasa del tejido. Después, se trataron con anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína (1:2000; originario de ratón, abcam, Inglaterra) como anticuerpo primario, seguido de reacción durante una noche. Se les trató con anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado como anticuerpo secundario, seguido de reacción a temperatura ambiente durante 90 minutos. Una vez completada la reacción, el tejido se trató con una solución de complejo de avidina y biotina incluida en el kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, EE. UU.), seguido de reacción durante 1 hora. El desarrollo del color se indujo usando diaminobencidina. La acumulación de oligómero de  $\alpha$ -sinucleína se midió contando las células positivas para  $\alpha$ -sinucleína. El grupo de control normal se trató con un disolvente y al control negativo se le administró por vía intraperitoneal rotenona a la dosis de 2,5 mg/kg una vez al día durante 5 semanas.

40 Como resultado, como se muestra en la tabla 54, el número de células positivas para  $\alpha$ -sinucleína se redujo en la sustancia negra (SN) del modelo animal de enfermedad de Parkinson al que administró el extracto en etanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (tabla 54).

[Tabla 54]

Disminución de células positivas para $\alpha$ -sinucleína en la sustancia negra (SN) de modelo animal de enfermedad de Parkinson mediante extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana			
Tratamiento		Dosis de inductor	Célula positiva para $\alpha$ -sinucleína (% del control)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)	(Rotenona, mg/kg)	
Control normal	-	-	100,27 $\pm$ 1,86
Control negativo	-	2,5	241,76 $\pm$ 15,24
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	10	2,5	116,45 $\pm$ 9,08

Ejemplo experimental 12: Efecto de terapéutico de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana sobre la enfermedad de Parkinson (inflamación cerebral) *in vivo*

<12-1> Construcción del modelo animal de neuroinflamación: modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por LPS

- 5 Para investigar el efecto de terapéutico *in vivo* del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención sobre la enfermedad de Parkinson, se construyó el modelo animal de enfermedad de Parkinson como se muestra en la figura 4 (figura 4).

Particularmente, se distribuyeron ratones macho C57BL/6 de 8 semanas de edad (peso: aproximadamente 19 ~ 22 g), seguido de adaptación en un laboratorio de animales del Kyung Hee University College of Pharmacy durante al menos 1 semana. En este momento, la temperatura interior se reguló a 22  $\pm$  2  $^{\circ}$ C y la humedad se controló al 53  $\pm$  3 %. El ciclo de luz y oscuridad se fijó a 12 h/12 h. El agua y los alimentos se proporcionaron libremente. Después de la adaptación, los ratones se agruparon en 4 grupos y a cada grupo se le asignaron 6 ratones. El liofilizado del extracto mixto en etanol al 90 % de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana (1:1:1) preparado en el ejemplo <5-1> se disolvió en agua, que se administró por vía oral (por vía oral, v.o.) a los ratones a la dosis de 10 o 30 mg/kg una vez al día durante 3 días. Después, a los ratones se les administró (intraperitoneal, i.p.) LPS (lipopolisacárido) a la dosis de 5 mg/kg después de la administración oral, dando como resultado la construcción del modelo animal de enfermedad de Parkinson. El grupo de control normal se trató con un disolvente y al control negativo se le administró LPS a la dosis de 5 mg/kg, pero no se trató con el extracto de la mezcla posteriormente.

20 <12-2> Efecto antiinflamación cerebral de un extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana

Para investigar el efecto de terapéutico *in vivo* del extracto de la mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de la presente invención sobre la enfermedad de Parkinson, los tejidos cerebrales se obtuvieron del modelo en rata de enfermedad de Parkinson tratado con el extracto de mezcla. El efecto antiinflamación cerebral del extracto de la mezcla se confirmó investigando la activación de astrocitos y microglías en la sustancia negra (SN) y el hipocampo de los tejidos cerebrales obtenidos anteriormente.

Particularmente, al modelo animal de neuroinflamación construido en el ejemplo experimental <12-1> se le administró zoletil (50 mg/kg) mediante inyección intramuscular para anestesia. Se perfundió PBS que contenía paraformaldehído al 4 % a través del corazón y después se extrajo el cerebro. El cerebro extraído se fijó una vez más en paraformaldehído al 4 % y después se sumergió en solución de sacarosa al 30 % a 4  $^{\circ}$ C hasta que el cerebro se hundió, que después se congeló. El tejido cerebral congelado se cortó en secciones coronales de 30  $\mu$ m usando un microtomo de criostato (Nombre del producto: CM3000, Leica, Alemania), y las secciones se almacenaron en glicerina, etilenglicol y PBS a 4  $^{\circ}$ C. Las secciones se colocaron en un cubreobjetos y se lavaron con PBS, seguido de un tratamiento con PBS que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1 % durante 15 minutos para eliminar la actividad peroxidasa del tejido. Después, se trataron con anticuerpo anti-GFAP (1:5000; originario de conejo, Neuromics, E.E. U.U.) o anticuerpo anti-Iba-1 (1:1000; originario de conejo, Dako, Japón) como anticuerpo primario, seguido de reacción durante una noche. Se les trató con anticuerpo anti-IgG de conejo biotinilado como anticuerpo secundario, seguido de reacción a temperatura ambiente durante 90 minutos. Una vez completada la reacción, el tejido se trató con una solución de complejo de avidina y biotina incluida en el kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, EE. UU.), seguido de reacción durante 1 hora. El desarrollo del color se indujo usando diaminobencidina. Los niveles de astrocitos y microglías activados en SN e hipocampo se midieron contando los números de células positivas para GFAP e Iba-1. El grupo de control normal se trató con un disolvente y al control negativo se le administró LPS a una dosis de 5 mg/kg y no se trató con el extracto de la mezcla de la invención posteriormente.

Como resultado, como se muestra en la tabla 55 y la tabla 56, las células positivas para GFAP e Iba-1 aumentadas por LPS en la sustancia negra (SN) del modelo en ratón de enfermedad de Parkinson se redujeron mediante la administración del extracto en etanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de manera dependiente de la dosis. El resultado anterior indicó que la activación de astrocitos y microglía se redujo, es decir, la inflamación del cerebro se redujo (tabla 55 y Tabla 56). Como se muestra en la tabla 57 y la tabla 58, las células positivas para GFAP e Iba-1 aumentadas por LPS en el hipocampo del modelo en ratón de enfermedad de

Parkinson se redujeron mediante la administración del extracto en etanol mixto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana de manera dependiente de la dosis. Igualmente, se redujo la activación de astrocitos y microglia, lo que sugiere que la inflamación cerebral se redujo (tabla 57 y tabla 58).

[Tabla 55]

Disminución de células (astrocitos) positivas para GFAP en la sustancia negra (SN) de modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por LPS mediante extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana			
Tratamiento		Dosis de inductor (LPS, mg/kg)	Célula positiva para GFAP (% del control)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)		
Control normal	-	-	5,76 ± 0,75
Control negativo	-	5	38,15 ± 4,97
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	10	5	14,28 ± 2,68
	30	5	9,41 ± 1,04

5

[Tabla 56]

Disminución de células (positivas para Iba-1 en la sustancia negra (SN) de modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por LPS mediante extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana			
Tratamiento		Dosis de inductor (LPS, mg/kg)	Célula positiva para Iba-1 (% del control)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)		
Control normal	-	-	8,79 ± 0,75
Control negativo	-	5	28,67 ± 0,49
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	10	5	22,09 ± 2,04
	30	5	17,08 ± 1,39

[Tabla 57]

Disminución de células positivas para GFAP en el hipocampo de modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por LPS mediante extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana			
Tratamiento		Dosis de inductor (LPS, mg/kg)	Célula positiva para GFAP (% del control)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)		
Control normal	-	-	20,48 ± 4,98
Control negativo	-	5	71,18 ± 3,63
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	10	5	38,05 ± 3,91
	30	5	21,24 ± 2,87

[Tabla 58]

Disminución de células positivas para Iba-1 en el hipocampo de modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por LPS mediante extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana			
Tratamiento		Dosis de inductor (LPS, mg/kg)	Célula positiva para Iba-1 (% del control)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)		
Control normal	-	-	18,67 ± 5,44

(continuación)

Disminución de células positivas para Iba-1 en el hipocampo de modelo en ratón de enfermedad de Parkinson inducida por LPS mediante extracto de mezcla de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana			
Tratamiento		Dosis de inductor (LPS, mg/kg)	Célula positiva para Iba-1 (% del control)
Sustancia de tratamiento	Dosis de extracto (mg/kg)		
Control negativo	-	5	58,15 ± 4,76
Extracto de mezcla 1:1:1 (p:p:p) de corteza de raíz de peonía + raíz de angélica china + raíz de hierba gitana	10	5	24,70 ± 3,31
	30	5	14,75 ± 3,08

Ejemplo de fabricación 1: Preparación de formulaciones farmacéuticas

<1-1> Preparación de polvos

Extracto de mezcla de la invención o su fracción	0,1 g
Lactosa	1,5 g
Talco	0,5 g

Los polvos se prepararon mezclando todos los componentes anteriores, que se cargaron en paquetes herméticos de acuerdo con el procedimiento convencional para preparar polvos.

5 <1-2> preparación de comprimidos

Extracto de mezcla de la invención o su fracción	0,1 g
Lactosa	7,9 g
Celulosa cristalina	1,5 g
Estearato de magnesio	0,5 g

Los comprimidos se prepararon mezclando todos los componentes anteriores mediante el procedimiento de formación de comprimidos directo convencional.

<1-3> Preparación de cápsulas

Extracto de mezcla de la invención o su fracción	0,1 g
Almidón de maíz	5 g
Carboxicelulosa	4,9 g

10 Las cápsulas se prepararon mezclando todos los componentes anteriores, que se cargaron en cápsulas duras de acuerdo con el procedimiento convencional para preparar cápsulas.

<1-4> Preparación de soluciones inyectables

Extracto de mezcla de la invención o su fracción	0,1 g
Agua destilada esterilizada	cantidad adecuada
Regulador del pH	cantidad adecuada

Las soluciones inyectables se prepararon mezclando todos los componentes anteriores, colocando la mezcla en ampollas de 2 ml y esterilizándola mediante el procedimiento convencional para preparar soluciones inyectables.

<1-5> Preparación de formulaciones líquidas

Extracto de mezcla de la invención o su fracción	0,1 g
Azúcar isomerizado	10 g
Manitol	5 g
Agua purificada	cantidad adecuada

15 Todos los componentes anteriores se disolvieron en agua purificada. Después de añadir sabor a limón, el volumen total se ajustó a 100 ml añadiendo agua purificada. Las formulaciones líquidas se prepararon colocando la mezcla en botellas marrones y esterilizándolas mediante el procedimiento convencional para preparar formulaciones líquidas.

Ejemplo de fabricación 2: Preparación de alimentos funcionales saludables

<2-1> Preparación de harinas alimenticias

Se añadieron a la harina 0,5 ~ 5,0 partes en peso del extracto de la mezcla de la presente invención o de la fracción del mismo. Los alimentos que mejoran la salud, tales como pan, pasteles, galletas, galletitas saladas y fideos se prepararon con la mezcla de harina de acuerdo con el procedimiento convencional.

5 <2-2> Preparación de sopas y salsas

Se añadieron 0,1 ~ 5,0 partes en peso del extracto de la mezcla de la presente invención o la fracción del mismo a las sopas y salsas. Los productos cárnicos, sopas y salsas que mejoran la salud se prepararon con esta mezcla mediante el procedimiento convencional.

<2-3> Preparación de carne de vacuno molida

10 La carne de vacuno molida que mejora la salud se preparó mezclando 10 partes en peso del extracto de la mezcla de la presente invención o la fracción del mismo con carne de vacuno molida de acuerdo con el procedimiento convencional.

<2-4> Preparación de carne de vacuno molida

15 Se añadieron a leche 5 ~ 10 partes en peso del extracto de la mezcla de la presente invención o la fracción del mismo. Los productos lácteos que mejoran la salud, tales como mantequilla y helado, se prepararon con la mezcla de leche de acuerdo con el procedimiento convencional.

<2-5> Preparación de Sun-Sik

El arroz integral, la cebada, el arroz glutinoso y el Yulmu (lágrimas de Job) se gelatinizaron de acuerdo con el procedimiento convencional, se secaron y se pulverizaron para obtener polvos de malla 60.

20 La soja negra, el sésamo negro y el sésamo silvestre se cocieron al vapor y se secaron de acuerdo con el procedimiento convencional y se pulverizaron para obtener polvos de malla 60.

El extracto de la mezcla de la presente invención o la fracción del mismo se concentró a presión reducida, se secó por pulverización y se pulverizó para obtener polvos secos de malla 60.

25 Se preparó Sun-Sik mezclando los polvos secos de los granos, las semillas y el extracto de la mezcla de la presente invención o la fracción del mismo de acuerdo con la siguiente proporción.

Granos (arroz integral: 30 partes en peso, Yulmu: 15 partes en peso, cebada: 20 partes en peso), Semillas (sésamo silvestre: 7 partes en peso, soja negra: 8 partes en peso, sésamo negro: 7 partes en peso), El extracto de la mezcla de la presente invención o la fracción del mismo (3 partes en peso),

30 *Ganoderma lucidum* (0,5 partes en peso),  
*Rehmannia glutinosa* (0,5 partes en peso)

<2-6> Preparación de suplementos alimenticios saludables

El extracto de la mezcla de la presente invención o la fracción del mismo 100 mg

Complejo vitamínico	cantidad adecuada
Acetato de vitamina A	70 µg
Vitamina E	1,0 mg
Vitamina B1	0,13 mg
Vitamina B2	0,15 mg
Vitamina B6	0,5 mg
Vitamina B12	0,2 µg
Vitamina C	10 mg
Biotina	10 µg
Amida de ácido nicotínico	1,7 mg
Ácido fólico	50 µg
Pantotenato de calcio	0,5 mg
Minerales	cantidad adecuada
Sulfato ferroso	1,75 mg
Óxido de zinc	0,82 mg
Carbonato de magnesio	25,3 mg

(continuación)

Complejo vitamínico	cantidad adecuada
Fosfato de potasio monobásico	15 mg
Fosfato de potasio dibásico	55 mg
Citrato de potasio	90 mg
Carbonato de calcio	100 mg
Cloruro de magnesio	24,8 mg

Las vitaminas y los minerales se mezclaron de acuerdo con la tasa de composición preferible para alimentos saludables. Sin embargo, la tasa de composición se puede ajustar. Los constituyentes se mezclaron de acuerdo con el procedimiento convencional para preparar alimentos saludables y después se preparó la composición para alimentos saludables de acuerdo con el procedimiento convencional.

5 Ejemplo de fabricación 3: Preparación de bebidas saludables

El extracto de la mezcla de la presente invención o la fracción del mismo 100 mg

Ácido cítrico	100 mg
Oligosacárido	100 mg
Extracto de albaricoquero japonés (Prunus mume)	2 mg
Taurina	100 mg
Agua purificada	hasta 500 ml

10 Los constituyentes anteriores se mezclaron de acuerdo con el procedimiento convencional para preparar bebidas saludables. La mezcla se calentó a 85 °C durante 1 hora con agitación y después se filtró. El filtrado se cargó en recipientes esterilizados de 1 l, que se sellaron y se esterilizaron de nuevo, se almacenaron en un refrigerador hasta que se usaran para la preparación de una composición para bebidas saludables.

Los constituyentes apropiados para las bebidas favoritas se mezclaron de acuerdo con la proporción de mezcla preferida, pero la proporción de la composición se puede ajustar de acuerdo con las preferencias regionales y nacionales, etc.

15 Los expertos en la materia apreciarán que las concepciones y realizaciones específicas desveladas en la descripción anterior pueden utilizarse fácilmente como base para modificar o diseñar otras realizaciones para llevar a cabo los mismos fines de la presente invención.

<110> Grupo de Cooperación Universidad-Industria de la Universidad Kyung Hee Dong-A Pharmaceutical Co., Ltd.

20 <120> Composición farmacéutica que contiene extracto de combinación de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana y fracciones del mismo para la prevención y el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo

<130> 2015P-08-046

<150> KR 10-2014-0124860

<151> 19/09/2014

<160> 16

25 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> COX III\_F

<400> 1

caatgatggc gcgatgtaac 20

35 <210> 2

<211> 20

<212> ADN



	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> COX III_R	
5	<400> 2 caatgatggc gcgatgtaac	20
	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> PARK7_F.	
	<400> 3 caatgatggc gcgatgtaac	20
	<210> 4	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> PARK7_R	
20	<400> 4 caatgatggc gcgatgtaac	20
	<210> 5	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> GRP78_F	
	<400> 5 caatgatggc gcgatgtaac	20
30	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> GRP78_R	
	<400> 6 caatgatggc gcgatgtaac	20
	<210> 7	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> XBP1p_F	
	<400> 7 caatgatggc gcgatgtaac	20
45	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

<220>  
 <223> XBP1p\_R  
  
 <400> 8  
 caatgatggc gcgatgtaac 20  
 5 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> iNOS\_F  
 10  
 <400> 9  
 caatgatggc gcgatgtaac 20  
  
 <210> 10  
 <211> 20  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> iNOS\_R  
 <400> 10  
 caatgatggc gcgatgtaac 20  
 20  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> IL-6\_F  
 <400> 11  
 caatgatggc gcgatgtaac 20  
  
 <210> 12  
 <211> 20  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> IL-6\_R  
 35 <400> 12  
 caatgatggc gcgatgtaac 20  
  
 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> p65/RELA\_F  
 <400> 13  
 caatgatggc gcgatgtaac 20  
 45 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> p65/RELA\_R  
 50

# ES 2 720 055 T3

<400> 14  
caatgatggc gcgatgtaac 20

5 <210> 15  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> 18s rRNA\_F

10 <400> 15  
caatgatggc gcgatgtaac 20

<210> 16  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

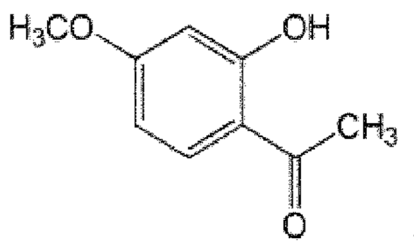
15 <220>  
<223> 18s rRNA\_R

<400> 16  
caatgatggc gcgatgtaac 20

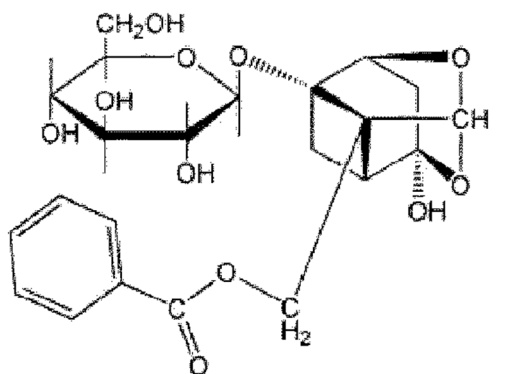
## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un extracto de corteza de raíz de peonía (Moutan Radicis Cortex), raíz de angélica china (Angelicae Dahuricae Radix) y raíz de hierba gitana (Bupleuri Radix), para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos neurológicos degenerativos.
- 5 2. La composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos neurológicos degenerativos de la reivindicación 1, en la que el extracto se extrae usando agua, alcohol inferior de C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> o una mezcla de los mismos, como disolvente.
3. La composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos neurológicos degenerativos de la reivindicación 2, en la que el alcohol inferior es etanol, metanol o butanol.
- 10 4. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una fracción de disolvente orgánico del extracto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1.
5. La composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos neurológicos degenerativos de la reivindicación 4, en el que el disolvente orgánico es uno o más disolventes seleccionados entre el grupo que consiste en cloroformo, hexano, acetato de etilo y butanol.
- 15 6. La composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos neurológicos degenerativos de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, en la que el extracto o la fracción del mismo comprende uno o más compuestos seleccionados entre el grupo que consiste en
- 20 paeonol (2'-hidroxi-4'-metoxiacetofenona) representado por la fórmula 1, paeoniflorina representada por la fórmula 2, paeoniflorigenona (benzoato de [(2s,3as,5s,7ar,8s)-3a-hidroxi-7a-metil-6-oxohexahidro-2,5-metano-1,3-benzodioxol-8-il]metilo) representada por la fórmula 3,
- imperatorina (9-[(3-metil-2-buten-1-il)oxi]-7h-furo[3,2-g] [1] benzopiran-7-ona) representada por la fórmula 4, saikosaponina A ((3beta,4alfa,16beta)-13,28-epoxi-16,23-dihidroiolean-11-en-3-il-6-desoxi-3-O-beta-D-glucopiranosil-beta-D-galactopiranosido) representada por la fórmula 5,
- 25 saikosaponina B2 ((3b,4a,16a)-16,23,28-trihidroioleana-11,13(18)-dien-3-il-6-desoxi-3-O-beta-D-glucopiranosil-beta-D-galactopiranosido) representada por la fórmula 6,
- saikosaponina B4 ((3beta,11alpha,16alpha)-16,23,28-trihidroxi-11-metoxiolean-12-en-3-il-6-desoxi-3-O-beta-D-glucopiranosil-beta-D-galactopiranosido) representada por la fórmula 7, y saikosaponina D ((3b,4a,16a)-13,28-epoxi-16,23-dihidroiolean-11-en-3-il-6-desoxi-3-O-beta-D-glucopiranosil beta-D-galactopiranosido) representada por la fórmula 8:

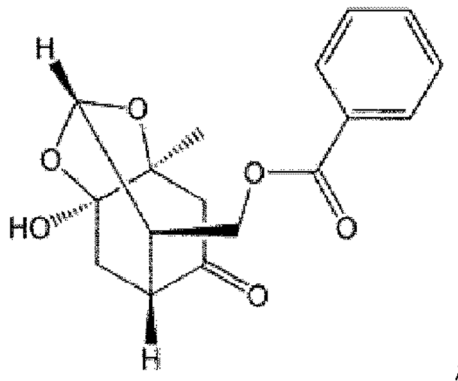
30 [Fórmula 1]



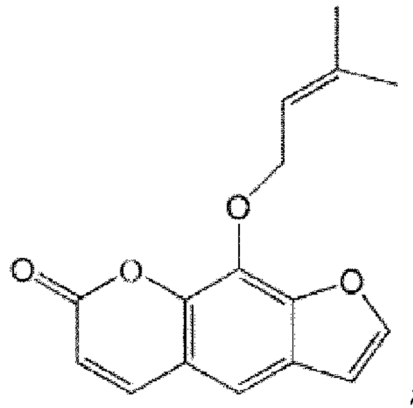
[Fórmula 2]



[Fórmula 3]

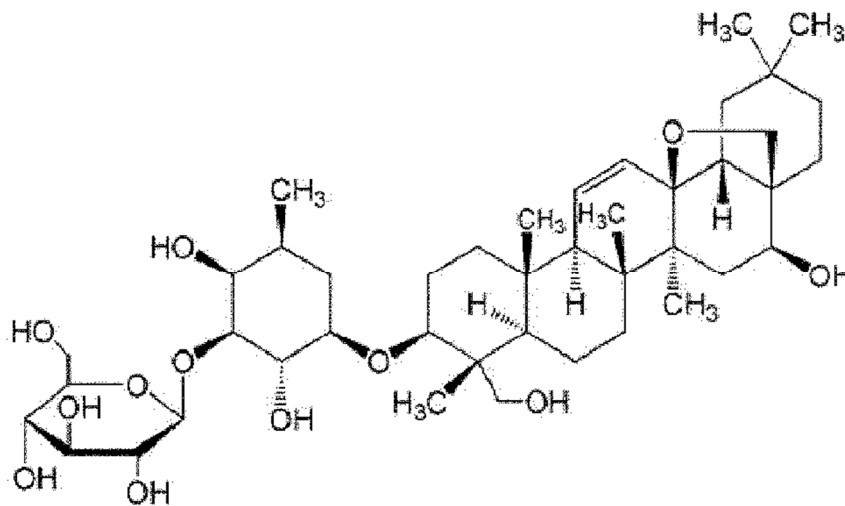


[Fórmula 4]

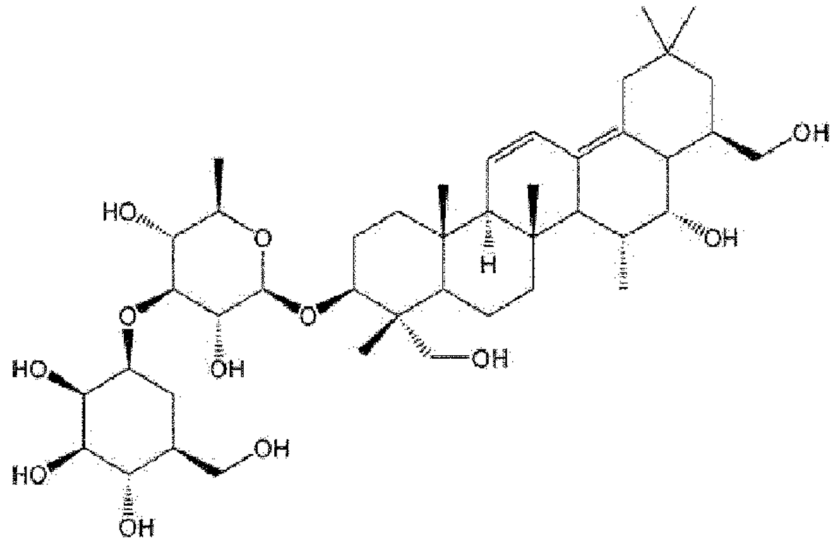


5

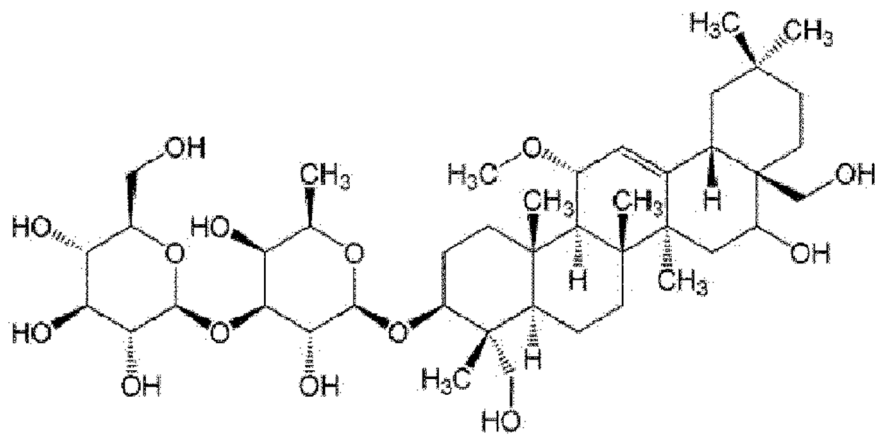
[Fórmula 5]



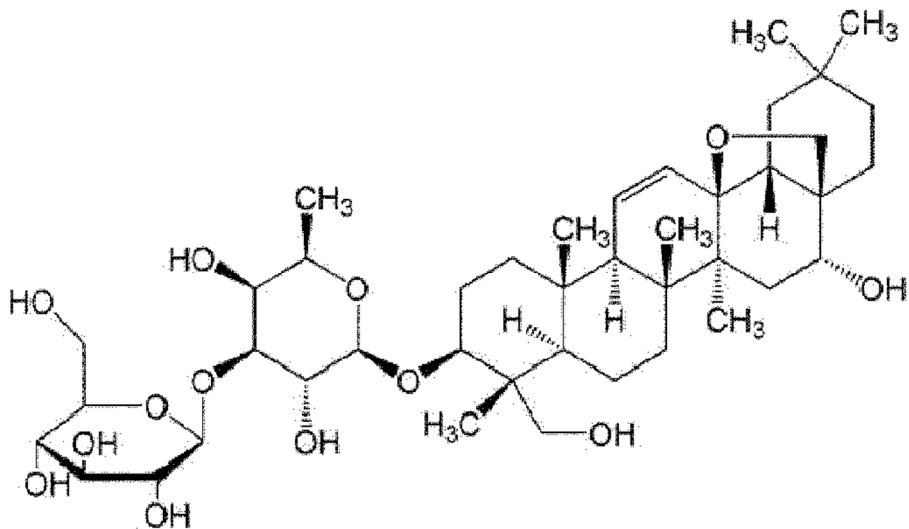
[Fórmula 6]



[Fórmula 7]



[Fórmula 8]



7. La composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos neurológicos degenerativos

de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, en la que el extracto o la fracción del mismo inhibe el daño funcional a las mitocondrias, el estrés del retículo endoplasmático o la respuesta inflamatoria.

5 8. La composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos neurológicos degenerativos de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, en la que el trastorno neurológico degenerativo se selecciona entre el grupo que consiste en demencia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad del Alzheimer, apoplejía, enfermedad de Lou Gehrig (esclerosis lateral amiotrófica) y lesión de la médula espinal.

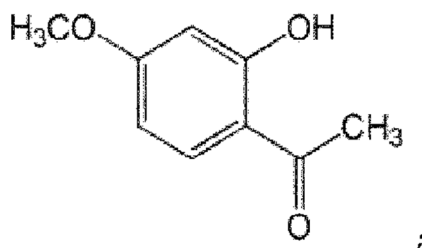
9. Un alimento funcional saludable que comprende un extracto de corteza de raíz de peonía, raíz de angélica china y raíz de hierba gitana, para su uso en la mejoría o la prevención de trastornos neurológicos degenerativos.

10 10. Un alimento funcional saludable para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende una fracción de disolvente orgánico del extracto para su uso de acuerdo con la reivindicación 9.

11. El alimento funcional saludable para su uso en la mejoría o la prevención de trastornos neurológicos degenerativos de la reivindicación 10, en el que el disolvente orgánico es uno o más disolventes seleccionados entre el grupo que consiste en cloroformo, hexano, acetato de etilo y butanol.

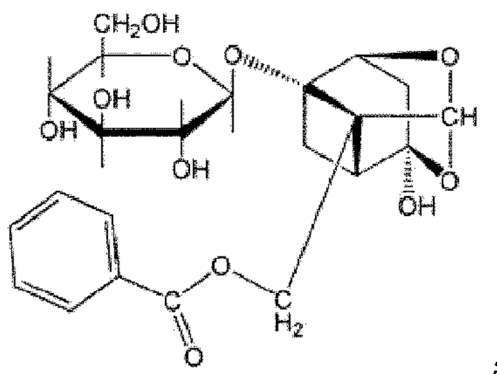
12. El alimento funcional saludable para su uso en la mejoría o la prevención de trastornos neurológicos degenerativos de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que el extracto o la fracción del mismo comprende uno o más compuestos seleccionados entre el grupo que consiste en paeonol representado por la fórmula 1, paeoniflorina representada por la fórmula 2, paeoniflorigenona representada por la fórmula 3, imperatorina representada por la fórmula 4, saikosaponina A representada por la fórmula 5, saikosaponina B2 representada por la fórmula 6, saikosaponina B4 representada por la fórmula 7, y saikosaponina D representada por la fórmula 8:

[Fórmula 1]

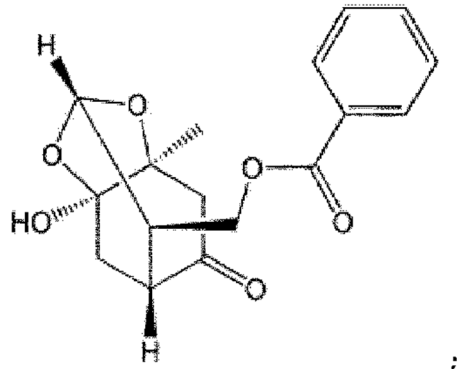


25

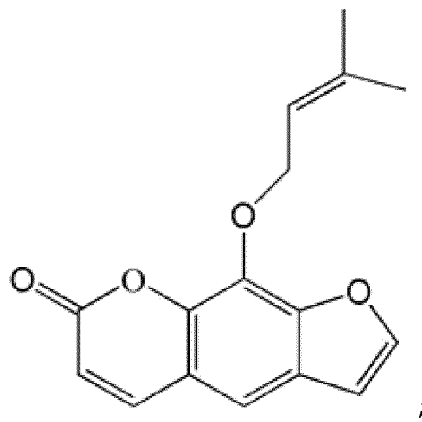
[Fórmula 2]



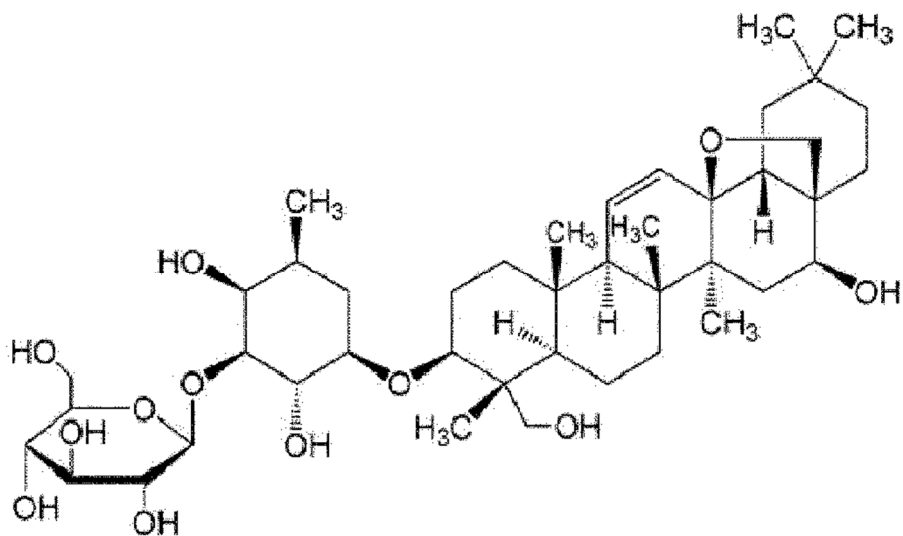
[Fórmula 3]



[Fórmula 4]

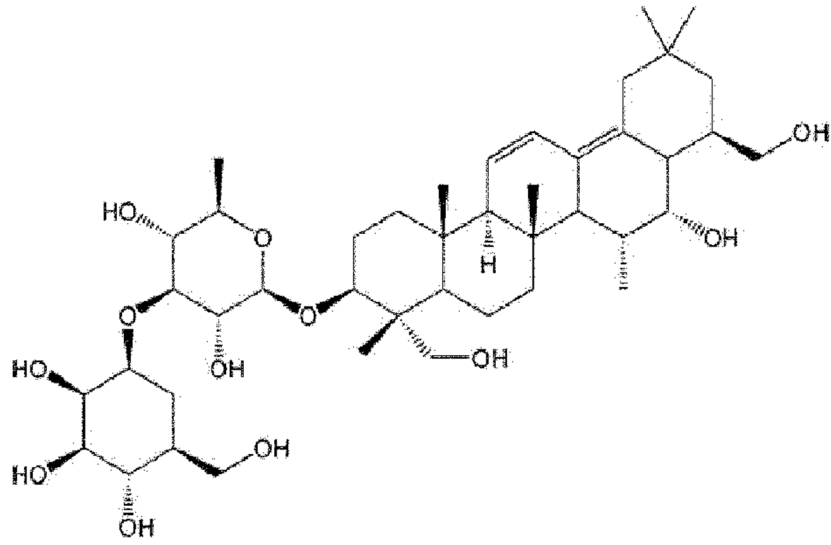


[Fórmula 5]

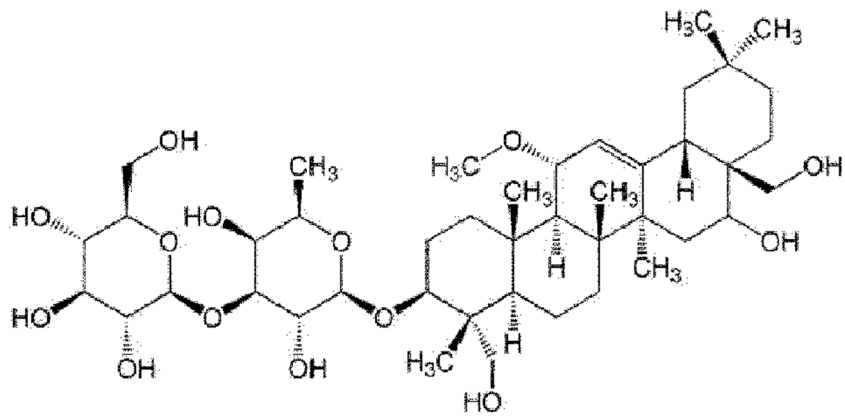


[Fórmula 6]





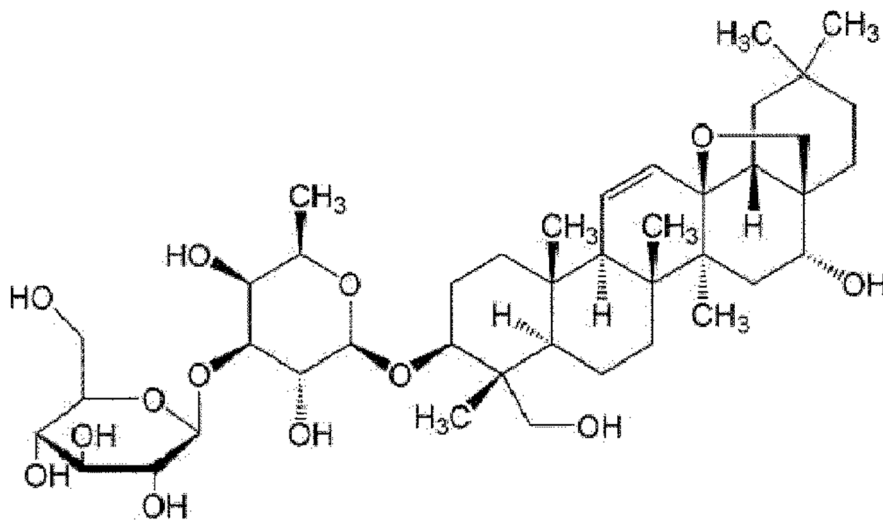
[Fórmula 7]



[Fórmula 8]

y

5

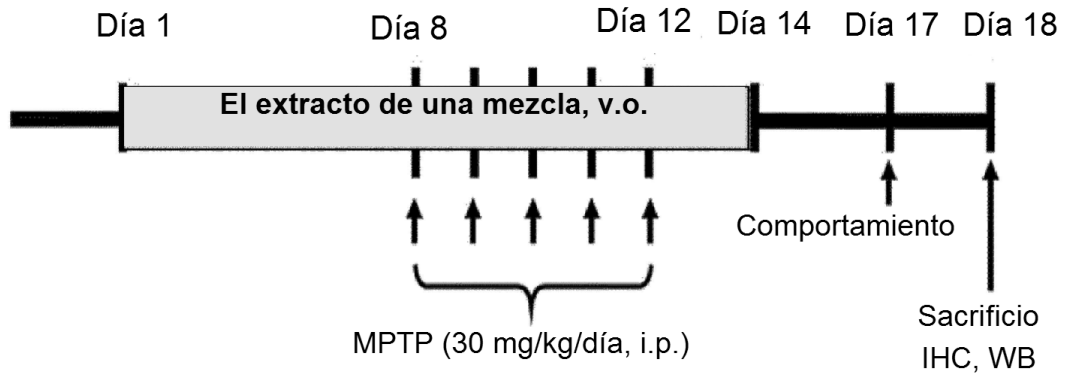


13. El alimento funcional saludable para su uso en la mejoría o la prevención de trastornos neurológicos degenerativos de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que el extracto o la fracción del mismo inhibe el daño funcional a las

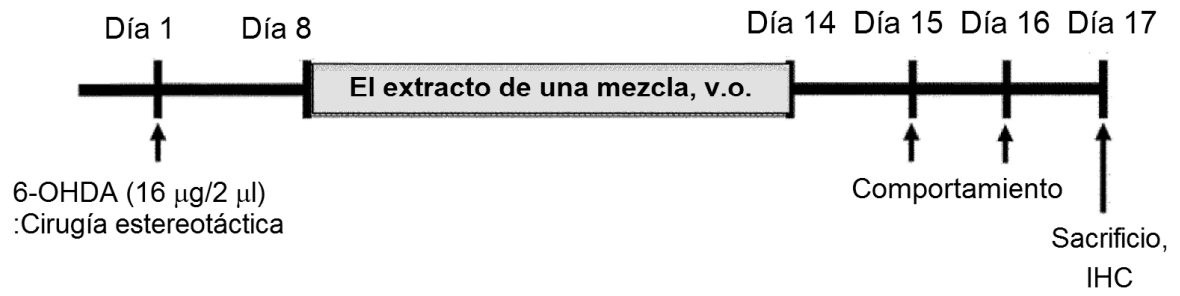
mitocondrias, el estrés del retículo endoplasmático o la respuesta inflamatoria.

- 5 14. El alimento funcional saludable para su uso en la mejoría o la prevención de trastornos neurológicos degenerativos de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que el trastorno neurológico degenerativo se selecciona entre el grupo que consiste en demencia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad del Alzheimer, apoplejía, enfermedad de Lou Gehrig (esclerosis lateral amiotrófica) y lesión de la médula espinal.

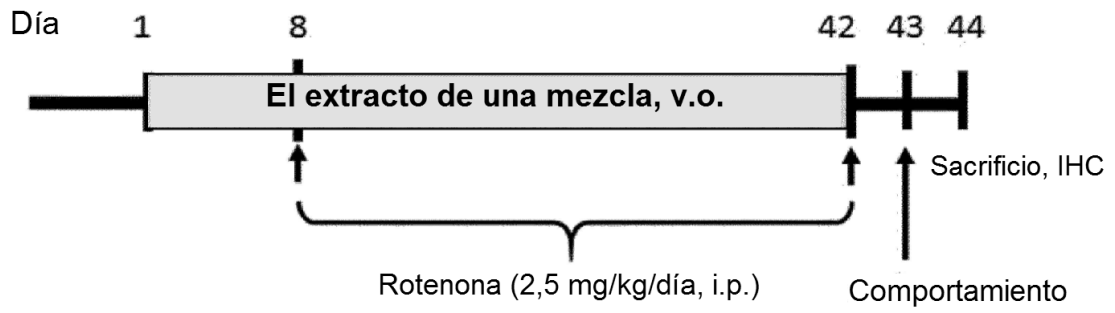
[Figura 1]



[Figura 2]



[Figura 3]



[Figura 4]

