

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 385**

51 Int. Cl.:

A61K 31/385 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2013 E 13725811 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2838529**

54 Título: **Composición que comprende ácido alfa-lipoico y honokiol para tratar neuropatías**

30 Prioridad:

20.04.2012 IT MI20120661

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

14.07.2016

73 Titular/es:

**GIELLEPI S.P.A. (100.0%)
Via Aurelio Saffi 21
20123 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**TERRUZZI, CARLO y
TERRUZZI, FABIO**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 577 385 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende ácido alfa-lipoico y honokiol para tratar neuropatías

5 La presente invención se refiere a una composición para el tratamiento de neuropatías y, en particular, a una composición para el tratamiento de síndromes sensoriales dolorosos de neuropatía periférica.

Se conocen numerosas composiciones útiles para la administración a personas que sufren neuropatías.

10 En particular, se sabe que las composiciones que comprenden ácido alfa-lipoico tienen un efecto beneficioso en el tratamiento de neuropatías, en especial de neuropatías periféricas adquiridas. De hecho, el ácido alfa-lipoico mejora la barrera antioxidante y reduce el estrés oxidativo aumentando los niveles de glutatión, mejora la velocidad de la comunicación nerviosa, de modo que optimiza su funcionalidad, y, finalmente, ejerce una acción de normalización contra la sensibilidad nerviosa, lo que reduce tanto el dolor como la turbidez sensorial.

15 Recientes estudios *in vivo* han confirmado los efectos neuroprotectores y cardioprotectores del ácido alfa-lipoico.

Se conocen composiciones de liberación rápida, o convencional, que comprenden ácido alfa-lipoico de la dieta para una única administración diaria de 300 mg o 600 mg de ácido alfa-lipoico.

20 Los estudios publicados "Oral Treatment With α -Lipoic Acid Improves Symptomatic Diabetic Polyneuropathy—The SYDNEY 2 trial" Dan Ziegler y otros, *Diabetes Care*, noviembre de 2006 vol. 29 n.º 11, pág. 2365–2370, y "Thioctic Acid and Acetyl-L-Carnitine in the Treatment of Sciatic Pain Caused by a Herniated Disc" Memeo Antonio y Mario Loiero, *Clin. Drug Investigation* 2008, Vol. 28, pág. 495–500, comunican que una dosis diaria de 600 mg de ácido alfa-lipoico ofrece la mejor relación riesgo/beneficio para el tratamiento de los síntomas de la polineuropatía diabética y el dolor ciático. Según el primer estudio, en comparación con una dosis diaria de 600 mg, las dosis más altas de 1.200 mg y 1.800 mg no proporcionan una mejor respuesta en términos de mejora de los síntomas de la polineuropatía diabética. En el estudio también se muestra un aumento dependiente de la dosis de los efectos secundarios relacionados con el ácido alfa-lipoico, tales como náuseas, vómitos y mareos.

30 También se sabe que la corteza de Magnolia, un fitoderivado obtenido de *Magnolia Officinalis*, perteneciente a la familia de Magnoliaceae, contiene dos compuestos fenólicos, honokiol y magnolol. Numerosas propiedades farmacológicas, tales como propiedades ansiolíticas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes, antiagregantes plaquetarios y neurotróficas se atribuyen a la corteza de Magnolia.

35 Y. Fukuyama, Nakade K., Minoshima Y., Yokoyama, A., H. Zhai, Y. Mitsumoto "Neurotrophic activity of honokiol on the cultures of fetal rat cortical neurons," *Bioorg. Med. Chem. Lett* 2002 Apr. 22; 12 (8):1163–6 da a conocer las actividades neurotróficas del honokiol a concentraciones entre 0,1 y 10 μ M sobre neuronas corticales de rata cultivadas. En las neuronas corticales, el honokiol es capaz de estimular el crecimiento de neuritas. Además, el honokiol ha demostrado que es capaz de aumentar la supervivencia y el desarrollo de las neuronas de cultivos primarios.

40 En cuanto a la actividad neurotrófica del honokiol, Lee YJ. y otros, "Therapeutic applications of compounds in the magnolia family," *Pharmacol. Ther.* 2011, 130 (2): 157–76 dan a conocer dosis eficaces en ratas que varían de 0,01 g/kg a 0,25 g/kg. No se conoce ningún estudio que muestre una dosificación eficaz para los seres humanos.

45 El documento US2006251608 da a conocer formulaciones para el tratamiento de la piel envejecida, que comprenden antioxidantes, coestimulantes de la antioxidación, agentes antiinflamatorios, vitaminas, minerales y estimulantes de la síntesis del colágeno. No se menciona ninguna eficacia de tales formulaciones para el tratamiento de neuropatías. El ácido alfa-lipoico y el honokiol se mencionan ambos como posibles antioxidantes en tales formulaciones, pero no se da a conocer específicamente una combinación de tales compuestos.

50 Se conocen suplementos nutricionales para deportistas, útiles para mejorar la masa muscular, la fuerza y la resistencia física, que incluyen, entre muchos otros componentes, también ácido alfa-lipoico y corteza de magnolia que contiene el 2% de honokiol. No se comunica un efecto de estos suplementos para el tratamiento de neuropatías y la cantidad de honokiol en tales suplementos es extremadamente reducida. En particular, la relación de honokiol y ácido alfa-lipoico en tales suplementos conocidos resulta ser inferior al 0,3%.

55 Por consiguiente, el objetivo de la presente invención es dar a conocer una composición que comprende ácido alfa-lipoico y que tiene una actividad mejorada en el tratamiento de los síntomas y el dolor neuropático. Dicho objetivo se consigue con una composición cuyas principales características se especifican en la primera reivindicación, y una formulación farmacéutica y dietética cuyas características se especifican en la reivindicación 9. Otras características de la composición y la formulación según la presente invención se especifican en las reivindicaciones restantes.

60 La composición según la presente invención comprende ácido alfa-lipoico, o una sal o complejo del mismo, y honokiol, y se caracteriza por el hecho de que la cantidad en peso de honokiol está entre el 1% y el 30% con

respecto al peso total de los dos componentes honokiol y ácido alfa-lipoico.

El ácido alfa lipoico contenido en la composición según la presente invención puede estar en forma racémica, es decir, puede ser una mezcla de las dos formas enantioméricas R y S, y/o sales o complejos de las mismas, o la composición según la presente invención puede comprender solo la forma enantiomérica R biológicamente activa, o una sal o complejo de la misma.

De hecho, los presentes inventores han encontrado, sorprendentemente, que la eficacia del ácido alfa-lipoico en el tratamiento de neuropatías y síndromes de dolor asociados con las mismas se potencia cuando dicho ácido alfa-lipoico se asocia con honokiol en ciertas proporciones, a causa de un efecto de sinergia.

En particular, los estudios realizados por los presentes inventores han demostrado que en cultivos primarios de neuronas, la administración de composiciones de ácido alfa-lipoico y honokiol según la presente invención es eficaz en la promoción de la extensión de las neuritas y la supervivencia de las células, mientras que una administración similar de composiciones que comprenden alfa ácido lipoico y honokiol en una cantidad de 0 a menos del 1% no es significativamente eficaz en la estimulación de la extensión de las neuritas.

Preferentemente, la cantidad en peso de honokiol en la composición según la presente invención está entre el 2% y el 15%, más preferentemente entre el 3% y el 10% con respecto al peso total de honokiol y ácido alfa-lipoico.

De hecho, se encontró que los intervalos mencionados anteriormente son las relaciones óptimas entre las concentraciones de ácido alfa-lipoico y honokiol, y en estas relaciones de los dos principios activos tienen un efecto sinérgico claro, tal como lo demuestra la comparación de la actividad significativa de la asociación con la actividad del ácido alfa-lipoico y de honokiol, cuando se utilizan de forma individual.

Tales como sales o complejos de ácido alfa-lipoico, se pueden utilizar, por ejemplo, sales solubles en agua, tales como R-lipoato de sodio o de potasio, y otras sales solubles del enantiómero R o del racemato RS en la composición según la presente invención.

La composición según la presente invención comprende preferentemente además otros principios activos que forman, en combinación con el ácido alfa lipoico o una sal o complejo del mismo y honokiol, una composición particularmente eficaz para el tratamiento de neuropatías no diabéticas y periféricas.

Preferentemente, por tanto, la composición según la presente invención comprende ácido gamma-linolénico o una sal o complejo, por ejemplo la sal de sodio del ácido gamma-linolénico. Preferentemente, la cantidad en peso de dicho ácido gamma-linolénico en la composición según la presente invención está entre el 2% y el 30% con respecto al peso total de honokiol y ácido alfa-lipoico. Más preferentemente, la cantidad en peso de dicho ácido gamma-linolénico en la composición según la presente invención está entre el 15% y el 25% en comparación con el peso total de honokiol y ácido alfa-lipoico.

La composición según la presente invención preferentemente comprende también una fuente fisiológicamente aceptable de selenio. Por fuente fisiológicamente aceptable de selenio, en la presente descripción y en las reivindicaciones, se entiende cualquier fuente de selenio asimilable, utilizable en las composiciones dietéticas o farmacéuticas, por ejemplo una sal de selenio o un complejo de selenio con un aminoácido. Preferentemente, se utiliza un compuesto seleccionado del grupo que consiste en selenometionina, selenito de sodio, selenato de sodio y levadura de selenio como fuente fisiológicamente aceptable de selenio.

Preferentemente, la cantidad en peso de dicha fuente fisiológicamente aceptable de selenio en la composición según la presente invención es adecuada para proporcionar una cantidad de selenio entre el 0,0001% y el 2% con respecto al peso total de honokiol y ácido alfa-lipoico. Más preferentemente, la cantidad en peso de dicha fuente fisiológicamente aceptable de selenio en la composición según la presente invención es adecuada para proporcionar una cantidad de selenio entre el 0,0001% y el 0,1% con respecto al peso total de honokiol y ácido alfa-lipoico.

La composición según la presente invención comprende también, preferentemente, al menos un componente seleccionado del grupo formado por vitamina C, vitamina E y vitaminas del grupo B, por ejemplo vitaminas B1, B2, B5, B6 y B12.

La composición según la presente invención puede formularse en cualquier forma adecuada para la administración oral. En particular, en un aspecto, la presente invención se refiere a una formulación dietética o farmacéutica para la administración oral, que comprende una composición tal como se ha definido anteriormente, en forma de una píldora, comprimido, cápsula, comprimido masticable, goma de mascar, pastillas, polvo para suspensión oral, polvo granulado para su reconstitución o polvo o bucal, suspensión oral, jarabe.

La composición según la presente invención puede comprender también excipientes, fragancias y otras sustancias aptas para su uso alimentario según el tipo de formulación farmacéutica deseada. Los excipientes adecuados para la producción de comprimidos o cápsulas son, por ejemplo, patata, trigo o almidón de maíz, almidón parcialmente

pregelatinizado, celulosa microcristalina, fosfato de calcio dibásico, carbonato de calcio, polioles tales como manitol y sorbitol, maltodextrina, lactosa, sílice coloidal, dióxido de silicio altamente disperso, behenato de glicerilo, propilenglicol, polivinilpirrolidona, polivinilpirrolidona reticulada, ésteres y éteres de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa), croscarmelosa de sodio, alginatos, carragenanos, estearato de magnesio, estearilfumarato de sodio, dióxido de titanio, gelatina, aceites vegetales tales como aceite de soja o de girasol, oleato de poliglicerol, glicerol, triglicéridos de ácidos grasos, lecitina.

Preferentemente, la formulación según la presente invención está en forma de comprimidos o cápsulas adecuadas para la administración diaria de una cantidad de ácido alfa-lipoico desde 200 mg a 1.300 mg, y de una cantidad de honokiol desde 2,5 mg a 150 mg.

Más preferentemente, la formulación según la presente invención está en forma de comprimidos o cápsulas adecuados para la administración diaria de una cantidad de 580 mg a 620 mg de ácido alfa-lipoico y una cantidad de 45 mg a 60 mg de honokiol, o adecuados para la administración diaria de una cantidad de 280 mg a 320 mg de ácido alfa-lipoico y de 20 mg a 30 mg de honokiol.

Incluso más preferentemente, la formulación según la presente invención está en forma de comprimidos o cápsulas adecuados para la administración diaria de una cantidad de 600 mg de ácido alfa-lipoico y de una cantidad de 54 mg de honokiol, o adecuados para la administración diaria de una cantidad de 300 mg de ácido alfa-lipoico y de 27 mg de honokiol.

Con la expresión "adecuado/a para la administración diaria de", en la presente descripción y en las reivindicaciones se entiende que cada cápsula o comprimido contiene las cantidades totales de los ingredientes activos específicos o fracciones de las mismas cantidades de modo que se permite la administración de la cantidad global mediante más cápsulas o comprimidos. Por ejemplo, las cápsulas o comprimidos que contienen aproximadamente 300 mg de ácido alfa-lipoico y 15 mg de honokiol se consideran adecuados para la administración diaria de aproximadamente 600 mg de ácido alfa-lipoico y 30 mg de honokiol.

El ácido gamma linolénico o una sal o complejo del mismo están contenidos en la formulación según la presente invención en cantidades que oscilan entre 10 mg y 300 mg.

Una formulación preferente según la presente invención es adecuada para la administración diaria de una cantidad de 580 mg a 620 mg de ácido alfa-lipoico, una cantidad de 45 mg a 60 mg de honokiol y una cantidad de 125 mg a 140 mg de ácido gamma-linolénico, y está en la forma de cápsulas blandas de gelatina. Otra formulación preferente según la presente invención, en forma de cápsulas blandas de gelatina, es adecuada para la administración diaria de una cantidad de 280 mg a 320 mg de ácido alfa-lipoico, de una cantidad de 20 mg a 30 mg de honokiol y una cantidad de 60 mg a 70 mg de ácido gamma-linolénico.

La fuente fisiológicamente aceptable de selenio ya descrita está contenida en la formulación según la presente invención en una cantidad tal como para proporcionar una cantidad de selenio entre 1 µg y 90 µg.

La vitamina C está preferentemente incluida en la formulación según la presente invención en una cantidad comprendida entre 20 mg y 1000 mg.

La vitamina E está preferentemente incluida en la formulación según la presente invención en una cantidad entre 1 mg y 100 mg.

La vitamina B1 está preferentemente incluida en la formulación según la presente invención en una cantidad entre 1 mg y 5 mg.

La vitamina B2 está preferentemente incluida en la formulación según la presente invención en una cantidad entre 1 mg y 5 mg.

La vitamina B5 está preferentemente incluida en la formulación según la presente invención en una cantidad entre 1 mg y 20 mg.

La vitamina B6 está preferentemente incluida en la formulación según la presente invención en una cantidad entre 1 mg y 8 mg.

La vitamina B12 está preferentemente incluida en la formulación según la presente invención en una cantidad que varía entre 0,001 mg y 0,020 mg.

Una formulación preferente según la presente invención comprende aproximadamente 600 mg de ácido alfa-lipoico, aproximadamente 54 mg de honokiol, aproximadamente 140 mg de ácido gamma-linolénico y aproximadamente 0,110 mg de selenito de sodio.

Otra formulación preferente según la presente invención comprende aproximadamente 300 mg de ácido alfa-lipoico, aproximadamente 27 mg de honokiol, y aproximadamente 66 mg de ácido gamma-linolénico y aproximadamente 0,055 mg de selenito de sodio.

- 5 La técnica de la preparación de la composición según la presente invención se selecciona dependiendo del tipo de administración y otras consideraciones prácticas.

10 Para la preparación de las formulaciones según la presente invención se puede utilizar cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica para la producción de comprimidos con un ingrediente activo de bajo punto de fusión, por ejemplo compresión directa después de la mezcla de polvos, compresión en húmedo o en seco después de la granulación (por ejemplo, en lecho fluido), la compresión de gránulos o pélets. La producción de cápsulas puede llevarse a cabo, por ejemplo, llenando armazones preformados (cuerpo) con polvos, gránulos, pequeños comprimidos o pélets y su posterior cierre mediante la aplicación de una cabeza; mediante la formación, posiblemente, de láminas coloreadas de gelatina, en las que se incorpora un plastificante adecuado y su carga simultánea con líquidos (por ejemplo, método de Sherer) o sólidos (por ejemplo, de método Accogel); mediante la adición a la gelatina de gotas de plastificante y, posiblemente, los principios activos, en soluciones oleosas frías (por ejemplo, método de goteo).

20 Las ventajas de las composiciones y formulaciones según la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de los siguientes ejemplos, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- La figura 1a muestra una fotografía de un cultivo de células primarias de neuronas corticales de rata tras 7 días en EtOH al 0,5%;
- La figura 1b muestra una fotografía de un cultivo de células primarias de neuronas corticales de rata tras 7 días en EtOH al 0,5% al que se han añadido 40 ng ml⁻¹ de bFGF;
- La figura 1c muestra una fotografía de un cultivo de células primarias de neuronas corticales de rata después de 7 días en EtOH al 0,5% al que se ha añadido una solución 10 µM de ácido alfa-lipoico al 99,7% y honokiol al 0,3%;
- La figura 1d muestra una fotografía de un cultivo de células primarias de neuronas corticales de rata después de 7 días en EtOH al 0,5% al que se ha añadido una solución 10 µM de ácido alfa-lipoico al 95,5% y honokiol al 4,5%;
- La figura 1e muestra una fotografía de un cultivo de células primarias de neuronas corticales de rata después de 7 días en EtOH al 0,5% al que se ha añadido una solución 10 µM de ácido alfa-lipoico al 91% y honokiol al 9%;
- La figura 1f muestra una fotografía de un cultivo de células primarias de neuronas corticales de rata después de 7 días en EtOH al 0,5% al que se ha añadido una solución 10 µM de ácido alfa-lipoico al 46% y honokiol al 54%;
- La figura 1d muestra una fotografía de un cultivo de células primarias de neuronas corticales de rata después de 7 días en EtOH al 0,5% al que se ha añadido una solución 10 µM de ácido alfa-lipoico solo;
- La figura 1h muestra una fotografía de un cultivo de células primarias de neuronas corticales de rata después de 7 días en EtOH al 0,5% al que se ha añadido una solución 10 µM de honokiol solo;
- La figura 2a muestra una fotografía de un cultivo de células primarias de neuronas corticales de rata tras 4 días en EtOH al 0,5%;
- La figura 2b muestra una fotografía de un cultivo de células primarias de neuronas corticales de rata después de 4 días en EtOH al 0,5% al que se ha añadido una solución 10 µM de ácido alfa-lipoico al 99,7% y honokiol al 0,3%;
- La figura 2c muestra una fotografía de un cultivo de células primarias de neuronas corticales de rata después de 4 días en EtOH al 0,5% al que se ha añadido una solución 10 µM de ácido alfa-lipoico al 91% y honokiol al 9%;
- La figura 2d muestra una fotografía de un cultivo de células primarias de neuronas corticales de rata después de 4 días en EtOH al 0,5% al que se ha añadido una solución 10 µM de ácido alfa-lipoico al 46% y honokiol al 54%.

50 **Materiales y métodos**

La pureza de los compuestos utilizados se verificó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, pico simple), mediante resonancia magnética nuclear (¹H) y (¹³C) y por espectrometría de masas de alta resolución.

55 El medio de cultivo fue medio de cultivo modificado de Dulbecco (DMEM), suero bovino fetal (FBS) y suplemento B27 y se obtuvieron de la firma Gibco BRL (NY, EE.UU.). Los reactivos PD98059 [2-(2-amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopirán-4-ona], LY294002 [2-(4-morfolinil)-8-fenil-1(4H) benzopirán-4-ona] y KN93 [sal de fosfato de N-[2-[N-(4-clorocinnamyl)-N-metilaminometil]fenil]-N-(2-hidroxiethyl)-4-metoxibencenosulfonamida] se adquirieron de la firma Sigma (MO, EE.UU.). Los factores de crecimiento de fibroblastos humanos recombinantes (bFGF) fueron suministrados por Upstate Biotechnology Inc. (Nueva York, EE.UU.). Todos los demás reactivos utilizados son los reactivos de mayor pureza disponibles en el mercado.

EJEMPLO 1 – Características morfológicas

65 Se prepararon ocho cultivos de células primarias tal como se da a conocer en Abe K y otros, "Effects of recombinant

human basic fibroblast growth factor and its modified protein CS23 on survival of primary cultured neurons from various regions of fetal rat brain", Jpn J Pharmacol 1990, 53 (2): 221–7. Todas las operaciones se llevaron a cabo en condiciones estériles.

5 Las células neuronales se separaron de los hemisferios cerebrales de fetos de rata de 18 días (Japan SLC, Inc.) y se suspendieron en FBS al 10%/MEM, después se sembraron a razón de 9.000 células cm⁻² en placas con poli-L-lisina.

10 Después de 24 horas, el medio de cultivo se reemplazó con un medio sin suero, específico para el crecimiento de las neuronas (medio neurobasal) suplementado con B27.

A continuación, se utilizó un primer cultivo (A) como cultivo de control.

15 A un segundo cultivo (B) se añadieron 40 ng ml⁻¹ de bFGF.

A un tercer cultivo (C) se añadió 99,7% en peso de ácido alfa-lipoico y 0,3% en peso de honokiol a la concentración global de 10 µM.

20 A un cuarto cultivo (D) se añadió 95,5% en peso de ácido alfa-lipoico y 4,5% en peso de honokiol a la concentración global de 10 µM.

A un quinto cultivo (E) se añadió 91% en peso de ácido alfa-lipoico y 9% en peso de honokiol a la concentración global de 10 µM.

25 A un sexto cultivo (F) se añadió 46% en peso de ácido alfa-lipoico y 54% en peso de honokiol a la concentración global de 10 µM.

A un séptimo cultivo (G) se añadió solo ácido alfa-lipoico a la concentración global de 10 µM.

30 A un octavo de cultivo (H) se añadió solo honokiol a la concentración global de 10 µM.

Después de 6 días de incubación, las células de los ocho cultivos se fijaron con formaldehído al 4%.

35 A continuación, se evaluaron los ocho cultivos en cuanto a la longitud de las neuritas a nivel microscópico. Las neuronas fueron sometidas a tinción inmunohistoquímica para detectar la proteína 2 asociada a los microtúbulos (MAP2) según el método histoquímico para la longitud de las neuritas, tal como se da a conocer en Fukuyama Y y otros, "Neurotrophic activity of honokiol on the cultures of fetal rat cortical neurons" Bioorg. Med Chem. Lett 12, 1163–66 (2002). La longitud de la neurita más extensa de todo el cuerpo celular se midió y se calculó utilizando los programas de software Lumina Vision y Mac-SCOPE, según el método mencionado anteriormente descrito en Y. Fukuyama y otros, (2002). Los análisis morfométricos se realizaron mediante la medición de la longitud de la neurita más larga de cada neurona utilizando el software Lumina Vision y Mac-Scope (Yoshiyasu Fukuyama y otros, 2002).

40 Los resultados se muestran en la tabla 1, en la que p indica la significación estadística y ns significa "no significativo".

45

Tabla 1

Cultivo	Relación ALA/honokiol	Incremento de la longitud promedio de las neuritas (µm)	Incremento respecto al control (cultivo A)
A	–	280	1
B	–	295 (p=ns)	1,05
C	ALA (99,7%) honokiol (0,3%)	450 (p= ns)	1,61
D	ALA (95,5%) honokiol (4,5%)	585,4 (p < 0,001)	2,09
E	ALA (91%) honokiol (9%)	630,7 (p < 0,001)	2,25
F	ALA (46%) honokiol (54%)	289 (p= ns)	1,03
G	ALA (100%)	285 (p=ns)	1,01
H	honokiol (100%)	287 (p=ns)	1,02

50 La longitud de las neuritas en los cultivos tratados con las composiciones analizadas según la presente invención, con una concentración de honokiol entre el 4,5% y el 9%, rellenó estas significativamente aumentada (p <0,001), mientras que los cultivos tratados con una composición que contenía ácido alfa-lipoico al 99,7% y honokiol al 0,3%

no mostraron un aumento estadísticamente significativo de la longitud de las neuritas. Se descubrió que la composición que comprende 95,5% en peso de ácido alfa-lipoico peso y 4,5% en peso de honokiol, y la que comprendía 91% en peso de ácido alfa-lipoico y 9% en peso de honokiol era eficaz en la estimulación significativa de la extensión considerable de las neuritas en comparación con el control (cultivo A) y con el cultivo suplementado con factores de crecimiento (cultivo B) y especialmente también con respecto al cultivo al que añadió una composición que comprendía 99,7% en peso de ácido alfa-lipoico peso y 0,3% en peso de honokiol (cultivo C). Cabe señalar que se descubrió que el efecto de la composición según la presente invención, tanto en las proporciones de 95,5% de ácido alfa-lipoico como de 4,5% honokiol, y de 91% de ácido alfa-lipoico y 9% de honokiol, era más significativo que el obtenido con el factor de crecimiento bFGF. La composición que comprendía 46% en peso de ácido alfa-lipoico y 54% en peso de honokiol inhibió el crecimiento de las neuritas en el cultivo de F.

Las composiciones que comprendían ácido alfa-lipoico solo u honokiol solo estimularon el crecimiento de las neuritas en una manera insignificante. El resultado es un valor no significativamente diferente del de la composición de control.

La figura 1 también muestra que, después de 7 días de cultivo celular, en los cultivos de C, D y E (figuras 1c, 1d y 1e), las neuronas mostraron neuritas extendidas que contenían somas neuronales más prominentes y oscuros en comparación con el cultivo A de control (figura 1a), y eran mejores, sobre todo en cuanto a los cultivos de D y E (figura 1d y 1e), con respecto a las culturas B (figura 1b) que contenía, respectivamente, 40 ng ml⁻¹ de bFGF y cultivos de ácido alfa-lipoico individual (figura 1d) u honokiol (figura 1h).

Los resultados del ensayo muestran que las composiciones según la presente invención tienen un efecto indudable e impredecible sobre la diferenciación de las neuronas corticales.

EJEMPLO 2- Evaluación de la supervivencia neuronal

Se prepararon cuatro cultivos de células primarias tal como se da a conocer en Abe K y otros, "Effects of recombinant human basic fibroblast growth factor and its modified protein CS23 on survival of primary cultured neurons from various regions of fetal rat brain", Jpn J Pharmacol 1990, 53 (2): 221-7. Todas las operaciones se llevaron a cabo en condiciones estériles. Las células neuronales se separaron de los hemisferios cerebrales de fetos de rata de 18 días (Japan SLC, Inc.) y se suspendieron en FBS al 10%/MEM, a continuación se sembraron a razón de 20.000 células cm⁻² en placas con poli-L-lisina.

Después de 24 horas, el medio de cultivo se reemplazó con un medio sin suero, específico para el crecimiento de las neuronas (medio neurobasal) suplementado con B27.

El procedimiento de los cultivos celulares fue esencialmente el mismo que el implementado en el ejemplo con NBM/B27 excepto que, como medio de cultivo sin suero, se utilizó DMEM suplementado con N2 (Cestelli A y otros, "Formulation of a novel synthetic medium for selectively culturing rat CNS neurons". Dev Brain Res 1985, 22,219); y también que las placas tenían una densidad celular igual a 2×10^5 cm⁻².

A continuación, se utilizó un cultivo (I) como cultivo de control.

A un cultivo (L) se añadió 99,7% en peso de ácido alfa-lipoico y 0,3% en peso de honokiol a la concentración de 10 µM.

A un cultivo (M) se añadió 91% en peso de ácido alfa-lipoico y 9% en peso de honokiol a la concentración de 10 µM.

A un cultivo (N) se añadió 46% en peso de ácido alfa-lipoico y 54% en peso de honokiol a la concentración de 10 µM.

Después de 3 días de incubación, las células de los cuatro cultivos se fijaron con formaldehído al 4%.

La supervivencia neuronal se evaluó mediante el método de WST-8 H Tominaga y otros, "A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay", Anal Commun 1999, 36,47. Este método utiliza una sal de 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disolfofenil)-2H tetrazolio como indicador cromógeno para evaluar la viabilidad de las células WST-8 y produce resultados sobre la viabilidad celular que están en línea con los obtenidos respectivamente con el método MTT utilizando bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolio, y con el método de captación de timidina tritiada.

Los resultados se muestran tanto en la tabla 2, en la que los valores se expresan como el promedio, como en la figura 2. En la tabla 2, p indica significación estadística y ns significa "no significativo".

Tabla 2

Cultivo	% de absorbancia a 450 nm con respecto al control (cultivo I)
I	100,0
L	106,0 (p= ns)
M	143,1 (p < 0,001)
N	29,7 (p < 0,001)

El cultivo M tiene valores que son significativamente más altos que el control I.

- 5 El cultivo I de referencia, en ausencia de principios activos, determinó la supervivencia de un pequeño número de neuronas. Por el contrario, en el cultivo M, la presencia de las composiciones según la presente invención a la concentración de 10 μ M, mostró una alta capacidad del crecimiento y supervivencia de las neuronas.

EJEMPLO 3

- 10 Se prepararon cuatro cultivos de células primarias tal como se da a conocer en el ejemplo 2 (como en Abe K y otros, "Effects of recombinant human basic fibroblast growth factor and its modified protein CS23 on survival of primary cultured neurons from various regions of fetal rat brain.", Jpn. J. Pharmacol. 1990; 53 (2): 221–7).

- 15 A continuación, se utilizó un cultivo (O) como cultivo de control.

A un cultivo (P) se añadió 91% en peso de ácido alfa-lipoico y 9% en peso de honokiol a la concentración global de 10 μ M.

- 20 A un cultivo (Q) se añadió 91% en peso de ácido alfa-lipoico y 9% en peso de honokiol a la concentración de 10 μ M y 0,003 μ M de selenio.

A un cultivo (R) se añadió 91% en peso de ácido alfa-lipoico y 9% en peso de honokiol a la concentración de 10 μ M y 0,24 μ M de ácido gamma linolénico.

- 25 Después de 3 días de incubación, las células de los cuatro cultivos se fijaron con formaldehído al 4%.

La supervivencia de las neuronas se evaluó mediante el ensayo de reducción de WST-8 (Tominaga y otros, 1999). Los resultados se muestran en la tabla 3 en la que los valores se expresan como promedios. Adicionalmente, p denota significación estadística.

- 30

Tabla 3

Cultivo	% de absorbancia a 450 nm con respecto al control (cultivo O)
O	100,0
P	143,1 (p < 0,001)
Q	178,9 (p < 0,001)
R	176,5 (p < 0,001)

- 35 Los resultados presentados en la tabla 3 muestran que, sorprendentemente, las composiciones según realizaciones preferentes de la presente invención, que comprenden selenio y/o ácido gamma-linolénico son particularmente eficaces en la mejora de la supervivencia de los cultivos neuronales. En particular, las composiciones utilizadas en los cultivos de Q y R son significativamente más eficaces que los utilizados para el cultivo de referencia O y que los utilizados en el cultivo de P.

- 40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende ácido alfa-lipoico, o una sal o complejo del mismo, y honokiol, caracterizada porque la cantidad en peso de dicho honokiol es de entre el 1% y el 30% con respecto al peso total del honokiol y del ácido alfa-lipoico.
2. Composición, según la reivindicación anterior, caracterizada porque la cantidad en peso de dicho honokiol se encuentra entre el 2% y el 15% con respecto al peso total del honokiol y el ácido alfa-lipoico.
- 10 3. Composición, según la reivindicación anterior, caracterizada porque la cantidad en peso de dicho honokiol se encuentra entre el 3% y el 10% con respecto al peso total del honokiol y el ácido alfa-lipoico.
- 15 4. Composición, según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque comprende ácido gamma-linolénico o una sal o complejo del mismo.
5. Composición, según la reivindicación anterior, caracterizada porque la cantidad de dicho ácido gamma-linolénico es de entre el 2% y el 30% con respecto al peso total del honokiol y el ácido alfa-lipoico.
- 20 6. Composición, según la reivindicación 3, caracterizada porque comprende una fuente fisiológicamente aceptable de selenio.
7. Composición, según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque comprende, como mínimo, un componente seleccionado del grupo que consiste en vitamina C, vitamina E, vitaminas B.
- 25 8. Composición, según una de las reivindicaciones anteriores, para su utilización en el tratamiento de neuropatías periféricas.
9. Formulación dietética o farmacéutica para administración oral, que comprende una composición según una de las reivindicaciones anteriores.
- 30 10. Formulación, según la reivindicación 9, en forma de comprimidos o cápsulas adecuados para la administración diaria de una cantidad de 200 a 1.300 mg de ácido alfa-lipoico y de 2,5 a 150 mg de honokiol.
- 35 11. Formulación, según la reivindicación 10, en forma de comprimidos o cápsulas adecuados para la administración diaria de una cantidad de 580 a 620 mg de ácido alfa-lipoico y de 45 a 60 mg de honokiol, o adecuados para la administración diaria de una cantidad de 280 a 320 mg de ácido alfa-lipoico y de 20 a 30 mg de honokiol.
- 40 12. Formulación, según la reivindicación 10, en forma de cápsulas de gelatina blanda, adecuada para la administración diaria de una cantidad de 200 a 1.300 mg de ácido alfa-lipoico, de 2,5 a 150 mg de honokiol y de 10 a 300 mg de ácido gamma-linolénico o una sal o complejo del mismo.
- 45 13. Formulación, según la reivindicación 11, en forma de cápsulas de gelatina blandas, adecuada para la administración diaria de una cantidad de 580 a 620 mg de ácido alfa-lipoico, de una cantidad de 45 a 60 mg de honokiol y de 125 a 140 mg de ácido gamma-linolénico o para la administración diaria de una cantidad de 280 a 320 mg de ácido alfa-lipoico, de una cantidad de 20 a 30 mg de honokiol y de 60 a 70 mg de ácido gamma-linolénico.

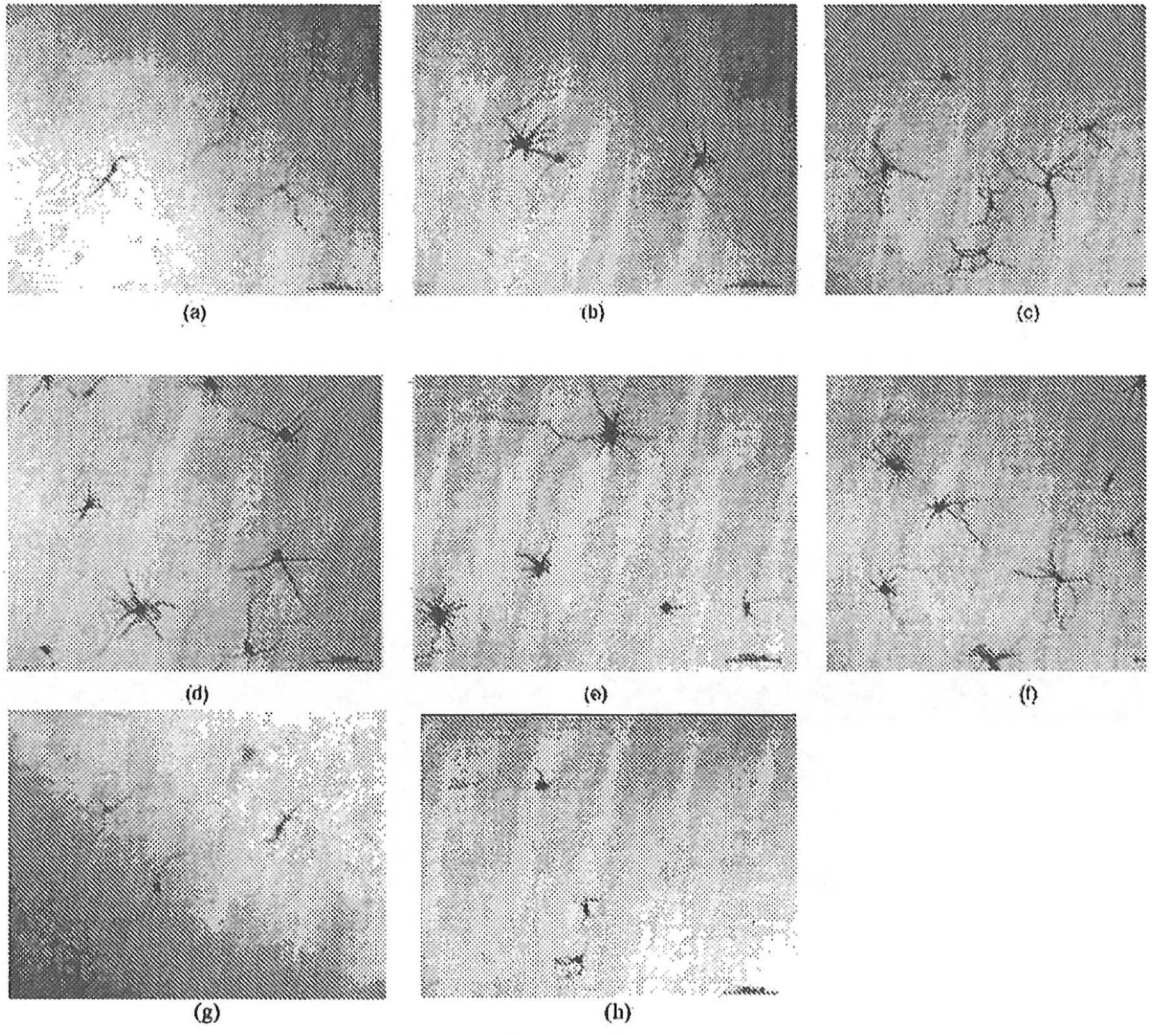


Fig.1

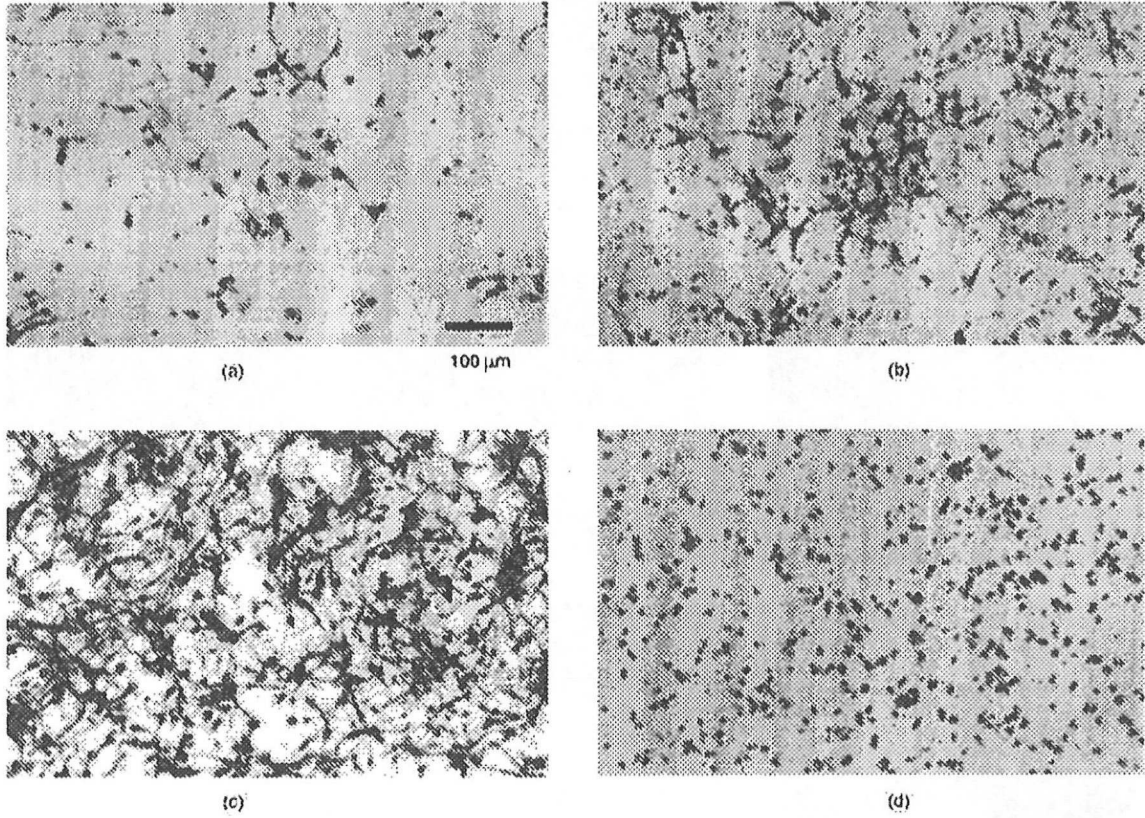


Fig.2