

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 641**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/8945** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61P 25/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2011 E 11860864 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2685997**

54 Título: **Composición que comprende el extracto de una combinación de hierbas para la prevención o el tratamiento de la neuropatía periférica diabética**

30 Prioridad:

**16.03.2011 KR 20110023564**

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

**21.09.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 583 641 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 el extracto de una combinación de hierbas para la prevención o el tratamiento de la neuropatía periférica diabética

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición para la profilaxis y el tratamiento de la neuropatía periférica diabética, que comprende un extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* a 3,5:1 (p/p).

Reconocimiento

La presente obra recibió el apoyo del Programa de Tecnología Líder Global de la Oficina de Planificación Estratégica de I + D (OSP), financiada por el Ministerio de Economía del Conocimiento, República de Corea. (n.º 10039303).

Antecedentes de la técnica

La frecuencia de la diabetes mellitus está aumentando rápidamente en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud estima que aproximadamente 180 millones de personas padecen diabetes mellitus desde 2008, con la perspectiva de que el número de diabéticos se duplique para el año 2030. Por consiguiente, los costos financieros y sociales asociados con la diabetes han aumentado, y se ha producido un aumento de la mortalidad por las complicaciones de la diabetes. Sin embargo, es posible retardar el comienzo o la progresión de la diabetes mediante el tratamiento riguroso del nivel de azúcar en sangre, por lo que es importante mantener la euglucemia con una modificación del estilo de vida y un tratamiento adecuado.

La diabetes mellitus es la principal causa conocida de neuropatía en los países desarrollados. La neuropatía periférica diabética es la expresión que se usa para describir los síntomas de acuerdo con la disfunción inducida por la diabetes del sistema nervioso periférico. Es la complicación más común a la que se enfrentan los diabéticos.

La neuropatía periférica diabética deteriora la calidad de vida de los pacientes con diabetes, y es la mayor fuente de mortalidad de los pacientes. La frecuencia de la neuropatía periférica diabética en pacientes con diabetes aumenta con la edad del paciente y la duración de la diabetes. La neuropatía periférica diabética se presenta en los pacientes con diabetes tanto de tipo 1 como de tipo 2, con mayor frecuencia en los pacientes con diabetes de tipo 2 (32,1 %) que en los pacientes con diabetes de tipo 1 (22,7 %) ("Primary Care Diabetes", Volumen 1, número 3, septiembre de 2007, páginas 129-134; "Diagnosis of diabetic peripheral neuropathy among patients with type 1 and type 2 diabetes in France, Italy, Spain, and the United Kingdom").

Aproximadamente el 10 % de los pacientes con diabetes se quejan de dolor constante, que puede ser espontáneo o puede ser inducido por estímulos. El dolor puede empeorar y convertirse incurable. El dolor neuropático periférico diabético normalmente se agrava por la noche, y se describe principalmente como una sensación de quemazón, dolor punzante, molestias, sensación de malestar, y similares. Además, el dolor neuropático periférico diabético se siente con mayor frecuencia en las piernas que en las manos. A menudo, el dolor grave puede conducir a la pérdida de peso o a la depresión ("Pain Medicine", Volumen 8, número S2 2007, "Diabetic Peripheral Neuropathic Pain: Recognition and Management").

La neuropatía periférica diabética se diagnostica mediante una prueba de fuerza muscular, y mediante la medición de la sensación táctil, la sensación de temperatura, la sensación vibratoria, el caudal sanguíneo de la piel periférica y la conducción nerviosa. La neuropatía periférica diabética actualmente se trata mediante el control del nivel de azúcar en sangre, el tratamiento etiológico y el tratamiento sintomático. Dado que la correlación entre la hiperglucemia y la progresión de la neuropatía está bien establecida y se ha puesto de manifiesto por muchos estudios que definen las altas tasas de frecuencia de la neuropatía periférica diabética en pacientes con diabetes que no han mantenido sus niveles de azúcar en sangre bajo control, el control del azúcar en sangre se reconoce como un método primario de prevención/tratamiento de la neuropatía periférica diabética (*N Engl J Med* 1993;329:977-86, "The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus").

Entre los agentes terapéuticos etiológicos de la neuropatía diabética son representativos el ácido alfa-lipoico, los inhibidores de la aldosa reductasa y el ácido gamma linoleico. El ácido  $\alpha$ -lipoico (ácido tióctico), un antioxidante, reduce el estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia que conduce a la muerte de las células nerviosas, bloqueando de este modo la etiología de la neuropatía diabética. Funcionando para evitar que la glucosa entre en la vía de los polioles de las células nerviosas, los inhibidores de la aldosa reductasa pueden suprimir la acumulación de sorbitol, que conduce a un daño de las células nerviosas, para bloquear la progresión de la neuropatía diabética. Sin embargo, el desarrollo de la mayoría de ellos se detuvo a medio camino debido a los efectos secundarios y a la eficacia insuficiente. Actualmente, solo se utiliza Epalrestat en Japón. El ácido  $\gamma$ -linolénico, que es tanto un componente de los fosfolípidos de la membrana nerviosa como un componente de la prostaglandina E, que

desempeña un papel importante en la homeostasis del flujo sanguíneo en las células nerviosas, ha resultado mejorar algunos síntomas de la neuropatía diabética (BMJ. 14 de julio de 2007; 335(7610):87. Epub 11 de junio de 2007, "Review. Effects of treatments for symptoms of painful diabetic neuropathy: systematic review").

5 Los agentes terapéuticos sintomáticos para aliviar el dolor de la neuropatía diabética incluyen antidepresivos tricíclicos, anticonvulsivos, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y capsaicina tópica. Los antidepresivos tricíclicos (ATC) actúan para inhibir la recaptación de la serotonina y la norepinefrina en el sistema nervioso central para bloquear la transmisión del dolor, así como para aumentar el nivel de endorfina endógena para aliviar el dolor. Los anticonvulsivos y los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina se usan como  
10 alternativas para los pacientes que son incompatibles con los ATC. La capsaicina tópica, conocida por su utilidad para la disestesia dolorosa, provoca la liberación del neuropéptido, la sustancia P de fibras nociceptivas de tipo C, y suprime la reposición de la sustancia P para interrumpir con la conducción y la propagación de las señales periféricas del dolor, lo que resulta en una reducción del dolor.

15 Sin embargo, es difícil encontrar terapias que traten adecuadamente a los pacientes con neuropatía periférica diabética, porque hay una gran versatilidad de etiologías y síntomas. En la práctica, se da preferencia al tratamiento sintomático para aliviar el dolor y suprimir la progresión de la neuropatía periférica diabética frente al tratamiento etiológico. Por lo tanto, hay una creciente necesidad de una terapia que pueda curar la neuropatía periférica diabética mediante la regeneración de los nervios afectados por la diabetes. El factor de crecimiento nervioso, que  
20 funciona para facilitar la regeneración de las neuronas, está surgiendo como un potente candidato para la terapia de la neuropatía periférica diabética.

Muchos estudios anteriores indican que se reducen tanto la biosíntesis del factor de crecimiento nervioso como el transporte retrógrado en las neuronas de sujetos con diabetes, y por ello, se consideran una etiología de la neuropatía periférica diabética. En las personas sanas, el NGF se produce en los queratinocitos dérmicos e interactúa con el receptor trkA. Por otro lado, se observa un bajo nivel de NGF en los queratinocitos dérmicos de los  
25 pacientes diabéticos, lo que se sabe que está asociado con la descompensación de las fibras nerviosas sensoriales (*Diabetes Obes Metab.* Febrero de 2008; 10(2):99-108. Epub 26 de junio de 2007, "Review. Diabetic neuropathy: new strategies for treatment").

30 Estudios anteriores han demostrado que la administración de NGF provocó una reducción del dolor y de los síntomas de los animales inducidos con neuropatía periférica diabética. Basándose en estos resultados, también se han realizado ensayos clínicos en pacientes con neuropatía diabética. En un ensayo clínico aleatorizado y controlado con placebo de fase 2, se aliviaron los síntomas y el dolor de los pacientes con neuropatía periférica  
35 diabética tras recibir NGF humano recombinante tres veces/semana durante 6 meses. Sin embargo, se realizó un ensayo clínico aleatorizado, controlado con placebo, de fase 3 durante 48 semanas, que no fue significativamente eficaz debido al dolor en el sitio de inyección y a efectos farmacéuticos irrelevantes. Así pues, los estudios posteriores se han dirigido a potenciar la biosíntesis del NGF endógeno en lugar de suministrar NGF externo (*Am J Med.* 30 de agosto de 1999;107(2B):345-42S, "Review. Neurotrophic factors in the therapy of diabetic neuropathy").

40 La Dioscorea Rhizoma, una planta que pertenece a *Dioscoreaceae*, es la expresión para el rizoma fresco de *Dioscorea batatas* Decaisne o *Dioscorea japonica* Thunberg, vacío de peridermis, o para el que se obtiene tras cocer el rizoma fresco al vapor y secarlo en la medicina a base de hierbas. La planta contiene la saponina dioscina de tipo esteroide y alantoina.

45 *Dioscorea nipponica*, un rizoma de la planta perenne trepadora *Dioscorea nipponica* Makino, contiene diversas saponinas de tipo esteroide, incluyendo dioscina, prosapogeno A y prosapogeno C.

50 En la medicina a base de hierbas, estas hierbas se han usado solas o en combinación con otras hierbas. En ninguna parte de los documentos anteriores se ha informado de la eficacia medicinal de un extracto de una combinación de estas dos hierbas en la neuropatía periférica diabética.

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

60 Los presentes inventores confirmaron que la función del extracto de una planta seleccionada entre *Dioscorea nipponica*, *Dioscorea quinqueoloba*, *Dioscorea batatas*, *Dioscorea japonica* y *Dioscorea tokora* era inducir el crecimiento significativo de las neuritas y aumentar la secreción de NGF endógeno según lo desvelado en la patente coreana n.º 854621. Sorprendentemente, los presentes inventores encontraron a través de experimentos con modelos animales que un extracto de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica*, en una proporción específica, garantiza efectos terapéuticamente sinérgicos sobre la neuropatía periférica diabética, elevando el nivel  
65 de NGF *in vivo*, por ejemplo, en el plasma y en la glándula salival, en un grado muy significativo, y aliviando el dolor inducido por la neuropatía diabética altamente sensible a los estímulos térmicos y mecánicos, mientras que los

extractos de cada una o una combinación de estas hierbas tienen casi los mismos efectos en términos del crecimiento de neuritas y de la secreción del factor de crecimiento nervioso endógeno, lo que culminó en la presente invención.

5 Divulgación de la invención

Problema técnico

10 Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición a base de hierbas, derivada de las hierbas desveladas en la patente coreana n.º 854621, que presenta la actividad de elevar significativamente *in vivo* el nivel de factor de crecimiento nervioso (NGF) terapéuticamente eficaz para la neuropatía periférica diabética.

15 Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica y un alimento funcional para la salud para la profilaxis y el tratamiento de la neuropatía periférica diabética, que comprende la composición a base de hierbas.

Solución al problema

20 Los objetos de la presente invención pueden llevarse a cabo mediante una disposición de una composición farmacéutica y un alimento funcional para la salud que comprende un extracto de hierbas fabricado a partir de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* 3,5:1 (p/p) útil para prevenir y tratar la neuropatía periférica diabética.

25 De acuerdo con un aspecto de la misma, la presente invención proporciona un extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica*. Más particularmente, el extracto de hierbas proporcionado por la presente invención se obtiene a partir de una mezcla que contiene *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en una proporción en peso de 3,5:1 (p/p).

30 El extracto de hierbas de acuerdo con la presente invención se puede preparar a partir de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* secos mediante precipitación en frío en etanol al 50 % a temperatura ambiente durante 48 horas, seguido de la concentración al vacío. En detalle, se lavan *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica*, se secan, se cortan y se mezclan a una proporción en peso de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* de 3,5:1, y se precipita en frío la mezcla de hierbas una vez en 5 pesos de etanol al 50 % a temperatura ambiente durante 48 horas, seguido de la concentración del extracto a presión reducida.

35 De acuerdo con otro aspecto de la misma, la presente invención proporciona una composición para la profilaxis y el tratamiento de la neuropatía periférica diabética, que comprende un extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* 3,5:1 (p/p) como principio activo en combinación con un vehículo, diluyentes o excipiente farmacéuticamente aceptables.

40 La composición de acuerdo con la presente invención contiene el extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* 3,5:1 (p/p) en una cantidad del 0,01 al 80 % en peso basado en el peso total de la composición, y preferentemente en una cantidad del 1 al 50 % en peso.

45 Debe ser evidente para los expertos en la materia que los síntomas de la neuropatía diabética incluyen la pérdida de sensibilidad, tal como la sensación táctil, la sensación vibratoria, la sensación de temperatura, etc., y el dolor, tal como sensación de quemazón, dolores punzantes, molestias, sensación de malestar, y similares.

50 La composición a base de un extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* 3,5:1 (p/p) de acuerdo con la presente invención puede comprender además un vehículo, excipiente o diluyente.

55 Los ejemplos del vehículo, excipiente o diluyentes útiles en la composición de la presente invención incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábica, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral.

60 La composición de la presente invención se puede formular en formas de dosificación orales tales como polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones, jarabes, aerosol, etc., agentes tópicos, supositorios o soluciones para inyección estériles. La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en combinación con un diluyente o excipiente, tal como una carga, un agente espesante, un aglutinante, un agente humectante, un disgregante, un tensioactivo, etc. Los preparados sólidos destinados a la administración oral pueden adoptar la forma de comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas y similares. En lo que respecta a estos agentes sólidos, el extracto de hierbas combinado de la presente invención se formula en combinación con al menos un excipiente tal como almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa o gelatina. Además de dichos excipientes simples, se pueden usar lubricantes tales como estearato de magnesio y talco. Los preparados líquidos destinados a la administración oral incluyen suspensiones, soluciones de uso interno, emulsiones, jarabes y similares. Además de

- un diluyente simple tal como agua o aceite de parafina, diversos excipientes tales como agentes humectantes, agentes edulcorantes, compuestos aromáticos, conservantes y similares pueden estar contenidos en los preparados líquidos. Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por una vía no oral. Para ello, se pueden usar soluciones acuosas estériles, disolventes no acuosos, suspensiones, emulsiones, liofilizados, supositorios y similares. El propilenglicol inyectable, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres tales como oleato de etilo pueden ser adecuados para los disolventes no acuosos y las suspensiones. Los materiales básicos de supositorios incluyen Witepsol, macrogol, Tween 61, manteca de cacao, manteca de laurina y glicerogelatina.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, la presente invención proporciona el uso de extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* 3,5:1 (p/p) en la preparación de un agente terapéutico para la neuropatía periférica diabética.
- De acuerdo con otro aspecto adicional de la misma, la presente invención proporciona un método de tratamiento de la neuropatía diabética, que comprende administrar una composición farmacéutica en una cantidad terapéuticamente eficaz a un mamífero que la necesita, comprendiendo dicha composición farmacéutica un extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* 3,5:1 (p/p).
- La dosis de la composición farmacéutica que comprende un extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* 3,5:1 (p/p) puede variar dependiendo de varios factores incluyendo la edad, el sexo, el peso y el estado de salud de los pacientes, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción y similares. Por lo general, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar en una sola dosis o en múltiples dosis al día, a una dosis diaria que varía de 0,01 a 10 g/kg y preferentemente de 1 a 5 g/kg. Sin embargo, los expertos en la materia han de entender que, de ningún modo, la dosis limita la presente invención.
- La composición farmacéutica que comprende un extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* 3,5:1 (p/p) de acuerdo con la presente invención se puede administrar por diversas vías a mamíferos tales como ratas, ratones, ganado, seres humanos, etc. Cabe esperar todas las vías de administración, por ejemplo, la composición farmacéutica se puede administrar por vía oral, intrarrectal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intrauterina, intradural o intracerebrovascular.
- Estando casi exento de toxicidad y de efectos secundarios, el extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* 3,5:1 (p/p) se puede ingerir con seguridad durante un largo período de tiempo con el fin de prevenir la neuropatía diabética.
- En la presente invención, se realizaron ensayos *in vivo* para examinar la capacidad del extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* 3,5:1 (p/p) para elevar el nivel de factor de crecimiento nervioso *in vivo* y aliviar los síntomas de la neuropatía periférica diabética. Los datos de modelos de animales que eran sanos y que padecían neuropatía diabética, respectivamente, expusieron que el extracto de la mezcla de hierbas a la proporción específica de acuerdo con la presente invención tuvo efectos terapéuticamente sinérgicos en comparación con los extractos de hierbas solos o mezclas de hierbas a otras proporciones en peso.
- De acuerdo con otro aspecto más de la misma, la presente invención contempla un alimento funcional para la salud para la prevención y la mejora de la neuropatía diabética, que comprende un extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* 3,5:1 (p/p) y un aditivo alimentario sitológicamente aceptable.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "alimento funcional para la salud" pretende incluir los definidos en la "Ley en materia de alimentos funcionales para la salud de 2002", tales como los alimentos para la salud que se encuentran en la lista que estipula los materiales alimentarios funcionales para la salud o los ingredientes verificados para la funcionalidad y seguridad para los seres humanos de acuerdo con la noticia de KFDA n.º 2004-12 de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Corea.
- Más particularmente, la presente invención proporciona un alimento funcional para la salud para la prevención y la mejora de la neuropatía diabética, que comprende un extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* 3,5:1 y un aditivo alimentario sitológicamente aceptable.
- La composición que comprende un extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* 3,5:1 de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a fármacos, alimentos y bebidas para aliviar los síntomas de la neuropatía diabética. Por ejemplo, los alimentos a los que se puede añadir el extracto de hierbas de la presente invención incluyen bebidas, goma de mascar, té, complejos vitamínicos y complementos alimentarios. Para su uso en fármacos, el extracto de hierbas puede estar en forma de píldoras, polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas o líquidos.
- Cuando se aplica a alimentos sólidos, el extracto de hierbas de la presente invención se puede usar en una cantidad del 0,1 al 15 % en peso basado en el peso total del alimento, y preferentemente en una cantidad del 0,2 al 10 % en

peso. En una forma líquida saludable, el extracto de hierbas de la presente invención puede variar en cantidad de 0,1 a 30 g por 100 ml de líquido y preferentemente de 0,2 a 5 g.

5 A excepción de la proporción específica dada a los ingredientes de hierbas indispensables, no se aplican limitaciones particulares en la composición líquida saludable. Como bebidas típicas, la composición líquida saludable puede comprender, además, diversos agentes aromatizantes, hidratos de carbono naturales u otros aditivos.

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

15 Además, la composición de la presente invención puede contener diversos nutrientes, vitaminas, minerales (electrolitos), agentes aromatizantes sintéticos y/o naturales, colorantes, cargas (queso, chocolate, etc.), ácido péctico y sus sales, ácido algínico y sus sales, ácidos orgánicos, espesantes coloidales protectores, modificadores del pH, estabilizantes, conservantes, glicerina, alcoholes, y agentes de carbonatación para bebidas carbonatadas. Para el uso en el zumo de fruta natural, bebidas de zumo de frutas o bebidas vegetales, la composición de la  
20 presente invención puede contener además pulpa de fruta. Estos aditivos se pueden usar solos o en combinación. Las cantidades típicas, pero sin importancia, de los aditivos son del orden de 0 a 20 partes en peso por 100 partes en peso de la composición.

25 Efectos ventajosos de la invención

Como se ha descrito hasta ahora, el extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma*:*Dioscorea nipponica* 3,5:1 (p/p) de acuerdo con la presente invención muestra efectos sinérgicos significativamente más altos en términos de la elevación del nivel *in vivo* del factor de crecimiento nervioso (NGF), del crecimiento de neuritas y de la capacidad cognitiva en comparación con los extractos de *Dioscorea Rhizoma* o *Dioscorea nipponica* solos o una  
30 mezcla de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en otras proporciones en peso, y por lo tanto, se puede usar en composiciones farmacéuticas y alimentos funcionales para la salud para la prevención y el tratamiento de la neuropatía periférica diabética.

35 Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 es de fotografías electrónicas que muestran el efecto del extracto del Ejemplo 1 sobre el nervio ciático de ratones con diabetes de tipo 1.  
La FIG. 2 es de fotografías electrónicas que muestran el efecto del extracto del Ejemplo 1 sobre el nervio ciático de ratas con diabetes de tipo 1.

40 Modo para la invención

La presente invención se puede comprender mejor a través de los siguientes ejemplos, que se exponen a modo ilustrativo, y que no se han de interpretar como limitantes de la presente invención.

45 EJEMPLO 1: Preparación de extracto de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica*

La *Dioscorea Rhizoma* y la *Dioscorea nipponica*, ambas en estado seco, se adquirieron en una tienda de medicinas a base de hierbas del mercado Kyoungdong, Corea. Tras eliminar las impurezas de las mismas, se cortaron las hierbas con una cuchilla y se mezclaron en una proporción en peso de *Dioscorea Rhizoma*:*Dioscorea nipponica* de 3,5:1. A 2 kg de la mezcla, se añadieron 10 l de una solución de etanol al 50 %, seguidos de la incubación a temperatura ambiente durante 48 horas con agitación. Se retiró la mezcla de hierbas por filtración, y se concentró la sustancia filtrada al vacío y se liofilizó, proporcionando un extracto mixto de hierbas (extracto en bruto) (véase la  
50 Tabla 1).

55 Tabla 1

[Tabla 1]

Rendimiento del extracto de hierbas combinadas de la invención									
Ex.	Cantidad del material		Disolvente	Cantidad de disolvente	Lavado	Temperatura de la extracción	Tiempo de extracción	Extracto en bruto (g)	Rendimiento (%)
	D. Rhizoma	D. <i>nipponica</i>							
Ej. 1	1,55 kg	0,45 kg	EtOH al 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	212,85	10,64

EJEMPLO COMPARATIVO 1: Preparación de extracto de *Dioscorea Rhizoma*

Se preparó un extracto de *Dioscorea Rhizoma* (extracto en bruto) de la misma manera que en el Ejemplo 1, con la excepción de que se usaron 2 kg de *Dioscorea Rhizoma* en lugar de 2 kg de la mezcla (véase la Tabla 2).

5

EJEMPLO COMPARATIVO 2: Preparación de extracto de *Dioscorea nipponica*

Se preparó un extracto de *Dioscorea nipponica* (extracto en bruto) de la misma manera que en el Ejemplo 1, con la excepción de que se usaron 2 kg de *Dioscorea nipponica* en lugar de 2 kg de la mezcla (véase la Tabla 2).

10 Tabla 2

[Tabla 2]

Rendimiento de los respectivos extractos de <i>D. Rhizoma</i> y <i>D. nipponica</i>									
n.º del Ej. comp.	Cantidad de materia		Disolvente	Cantidad de disolvente	Lavado	Temperatura de la extracción	Tiempo de extracción	Extracto en bruto (g)	Rendimiento (%)
	<i>D. Rhizoma</i>	<i>D. nipponica</i>							
1	2 kg	-	EtOH al 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	253,8	12,69
2	-	2 kg	EtOH al 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	160,0	8,00

EJEMPLO COMPARATIVO 3 a 10: Preparación de extractos de mezclas de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica*

15

Se usaron las mismas hierbas *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* usadas en el Ejemplo 1. Se cortaron *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* con una cuchilla y se mezclaron en las proporciones en peso presentadas en la Tabla 3. A 2 kg de las mezclas, se añadieron 10 l de una solución de etanol al 50 %, seguidos de la incubación a temperatura ambiente durante 48 horas con agitación. Se retiraron las mezclas de hierbas por filtración, y se concentró la sustancia filtrada al vacío y se liofilizó, proporcionando extractos mixtos de hierbas (extractos en bruto)

20

Tabla 3

[Tabla 3]

Rendimiento del extracto combinado de la mezcla de <i>D. Rhizoma</i> y <i>D. nipponica</i>									
n.º del Ej. comp.	Cantidad de materia		Disolvente		Lavado	Temperatura de la extracción	Tiempo de extracción	Extracto en bruto (g)	Rendimiento (%)
	<i>D. Rhizoma</i>	<i>D. nipponica</i>	Tipo	Cantidad					
3	1	1	EtOH al 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	179,05	8,95
4	1,33	0,67	EtOH al 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	135,96	6,80
5	1,67	0,33	EtOH al 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	160,07	8,00
6	1,82	0,18	EtOH al 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	138,75	6,93
7	0,67	1,33	EtOH al 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	153,56	7,68
8	0,45	1,55	EtOH al 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	139,15	6,96
9	0,33	1,67	EtOH al 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	181,06	9,05
10	0,18	1,82	EtOH al 50 %	10 l	1 l	Temperatura ambiente	2 días	146,43	7,32

25

EJEMPLO DE ENSAYO 1: Ensayo para el nivel *in vivo* de factor de crecimiento nervioso en el modelo de ratón normal

5 Se evaluó la capacidad del extracto en bruto con etanol al 50 % del Ejemplo 1 para inducir la secreción de factor de crecimiento nervioso *in vivo* (O. Arrieta y J. Sotelo *et al.*, "Retinoic acid increases tissue and plasma contents of nerve growth factor and prevents neuropathy in diabetic mice". *European Journal of Clinical Investigation* (2005) 35).

10 Se aclimataron ratones ICR machos, con un peso de 25 ~ 30 g, durante 1 semana a 22-24 °C a una humedad relativa del 60-80 %, mientras que se alimentaban con agua y una dieta convencional. Se dividieron en grupos según el peso. Se administraron oralmente los extractos preparados en los ejemplos anteriores a los ratones en cantidades predeterminadas, con gabapentina usada como control positivo a una dosis de 100 mg/kg, y 16 horas después, se tomaron muestras de sangre de los ratones. Posteriormente, fueron sacrificados para extraer el nervio ciático y las glándulas salivales.

15 Tras centrifugar las muestras de sangre a 10.000 rpm durante 10 min, se midieron los niveles de factor de crecimiento nervioso en el plasma así separado mediante ELISA (absorbancia a 450 nm). Se pesaron el nervio ciático y las glándulas salivales, y se añadió una solución que contenía Tris-HCl 100 mM, NaCl 1 M, BSA al 2 %, EDTA 4 mM, Trition®X-100 al 2,0 %, azida de sodio al 0,02 %, 0,1 mg/ml de pepstatina A, 5 mg/ml de aprotinina, 0,5 mg/ml de antipaína, 167 mg/ml de benzamidina y 5,2 mg/ml de PMSF en cantidades proporcionales a los pesos, seguido de la homogeneización. Se incubaron las sustancias homogenizadas durante 15 min con HCl 1 N en una cantidad de 1 µl/50 µl para la oxidación y se neutralizaron con NaOH 1 N en una cantidad de 1 µl/50 µl. Se realizó la centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min, obteniéndose sobrenadantes. Como el plasma, se analizaron cuantitativamente el nervio ciático y las glándulas salivales para determinar el nivel de factor de crecimiento nervioso.

25 Los datos se resumen en la Tabla 4 para los niveles de NGF en plasma, en la Tabla 5 para los niveles de NGF del nervio ciático, y en la Tabla 6 para los niveles de NGF de las glándulas salivales.

Tabla 4

30

[Tabla 4]

Nivel de NGF en plasma					
Grupo	Cantidad de material (kg)		Proporción en peso de <i>D. Rhizoma:D. nipponica</i>	Dosis (mg/kg)	Nivel de NGF en plasma (pg/ml)
	<i>D. Rhizoma</i>	<i>D. nipponica</i>			
Control					601,5
Ej. 1	1,55	0,45	3,5:1	100	1106,9
Ej. comp. 1	2	-	-	100	606,2
Ej. comp. 2	-	2	-	100	602,1
Ej. comp. 3	1	1	1:1	100	663,6
Ej. comp. 4	1,33	0,67	1:2	100	689,9
Ej. comp. 5	1,67	0,33	5:11	100	725,6
Ej. comp. 6	1,82	0,18	10:1	100	696,8
Ej. comp. 7	0,67	1,33	1:2	100	607,0
Ej. comp. 8	0,45	1,55	1:3,5	100	656,0
Ej. comp. 9	0,33	1,67	15	100	642,6
Ej. comp. 10	0,18	1,82	1:10	100	640,7
Gabapentina				100	610,4

35 Cuando se administraron a la misma dosis, como se puede observar en la Tabla 4, el extracto de *Dioscorea Rhizoma* del Ejemplo comparativo 1, el extracto de *Dioscorea nipponica* del Ejemplo comparativo 2 y los extractos de mezclas de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* de los Ejemplos comparativos 3 a 10, mostraron inducir la secreción del factor de crecimiento nervioso en plasma en un grado similar al del control. Por el contrario, el extracto del Ejemplo 1 aumentó el nivel de NGF en plasma frente al obtenido por el extracto de *Dioscorea Rhizoma*, el extracto de *Dioscorea nipponica* o los extractos de mezclas de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en otras proporciones en peso.

40

El aumento del nivel de factor de crecimiento nervioso en plasma, una vía a través de la que el factor de crecimiento nervioso se mueve hacia las dianas, indica la potenciación de la secreción de factor de crecimiento nervioso. Por lo tanto, el extracto de una mezcla de Dioscorea Rhizoma:*Dioscorea nipponica* a 3,5:1 (p/p) de acuerdo con la presente invención potencia además la secreción de factor de crecimiento nervioso para aumentar significativamente el nivel de NGF *in vivo*, en comparación con los extractos de Dioscorea Rhizoma solo, *Dioscorea nipponica* solo o de mezclas de Dioscorea Rhizoma y *Dioscorea nipponica* en otras proporciones en peso.

Tabla 5

[Tabla 5]

Nivel de NGF en el nervio ciático					
Grupo	Cantidad de material (kg)		Proporción en peso de D. Rhizoma: <i>D. nipponica</i>	Dosis (mg/kg)	Nivel de NGF en el nervio ciático (pg/mg)
	D. Rhizoma	D. <i>nipponica</i>			
Control					3,3
Ej. 1	1,55	0,45	3,5:1	100	7,5
Ej. comp. 1	2	-	-	100	3,8
Ej. comp. 2	-	2	-	100	3,6
Ej. comp. 3	1	1	1:1	100	4,6
Ej. comp. 4	1,33	0,67	1:2	100	4,1
Ej. comp. 5	1,67	0,33	5:1	100	4,0
Ej. comp. 6	1,82	0,18	10:1	100	3,2
Ej. comp. 7	0,67	1,33	1:2	100	5,1
Ej. comp. 8	0,45	1,55	1:3,5	100	4,6
Ej. comp. 9	0,33	1,67	15	100	4,0
Ej. comp. 10	0,18	1,82	1:10	100	4,9
Ácido $\alpha$ -lipoico				50	5,0
Gabapentina				100	4,2

Las observaciones mostraron que, cuando se administraron a la misma dosis, como se puede observar en la Tabla 5, el extracto de Dioscorea Rhizoma del Ejemplo comparativo 1, el extracto de *Dioscorea nipponica* del Ejemplo comparativo 2 y los extractos de mezclas de Dioscorea Rhizoma y *Dioscorea nipponica* de los Ejemplos comparativos 3 a 10, secretaron factor de crecimiento nervioso en el nervio ciático en un grado similar al del control. Por el contrario, el extracto del Ejemplo 1 aumentó el nivel de NGF en el nervio ciático frente al obtenido por el extracto de Dioscorea Rhizoma, el extracto de *Dioscorea nipponica* o los extractos de mezclas de Dioscorea Rhizoma y *Dioscorea nipponica* en otras proporciones en peso

Por consiguiente, el extracto de una mezcla de Dioscorea Rhizoma:*Dioscorea nipponica* a 3,5:1 de acuerdo con la presente invención puede inducir la secreción de NGF en la sangre, lo que resulta en un aumento significativo del nivel de NGF en el nervio ciático, el tejido diana.

Tabla 6

[Tabla 6]

Nivel de NGF en la glándula salival					
Grupo	Cantidad de material (kg)		Proporción en peso de D. Rhizoma: <i>D. nipponica</i>	Dosis (mg/kg)	Nivel de NGF en la glándula salival (ng/mg)
	D. Rhizoma	D. <i>nipponica</i>			
Control					166,1
Ej. 1	1,55	0,45	3,5: 1	100	221,7
Ej. comp. 1	2	-	-	100	171,6

Nivel de NGF en la glándula salival					
Grupo	Cantidad de material (kg)		Proporción en peso de D. Rhizoma:D. <i>nipponica</i>	Dosis (mg/kg)	Nivel de NGF en la glándula salival (ng/mg)
	D. Rhizoma	D. <i>nipponica</i>			
Ej. comp. 2	-	2	-	100	170,1
Ej. comp. 3	1	1	1:1	100	206,2
Ej. comp. 4	1,33	0,67	2:1	100	193,3
Ej. comp. 5	1,67	0,33	5:1	100	177,4
Ej. comp. 6	1,82	0,18	10:1	100	202,5
Ej. comp. 7	0,67	1,33	1:2	100	173,4
Ej. comp. 8	0,45	1,55	1:3,5	100	200,2
Ej. comp. 9	0,33	1,67	15	100	181,2
Ej. comp. 10	0,18	1,82	1:10	100	188,1
Ácido $\alpha$ -lipoico				50	164,4
Gabapentina				100	193,1

Como resulta evidente a partir de los datos de la Tabla 6, cuando se administraron a la misma dosis el extracto de Dioscorea Rhizoma del Ejemplo comparativo 1 y el extracto de *Dioscorea nipponica* del Ejemplo comparativo 2 aumentaron el nivel de NGF en las glándulas salivales solamente en un 2 ~ 3 %, en comparación con el control, mientras que los extractos de mezclas de Dioscorea Rhizoma y *Dioscorea nipponica* de los Ejemplos comparativos 3 a 10 indujeron la secreción de NGF en las glándulas salivales en grados similares o inferiores a los obtenidos por el control positivo de gabapentina. Por el contrario, el nivel de NGF en las glándulas salivales fue aumentado en un 33,5 % por el extracto del Ejemplo 1. Es decir, el extracto de la presente invención permitió un aumento significativo del nivel de NGF en la glándula salival, en comparación con los extractos de Dioscorea Rhizoma solo, *Dioscorea nipponica* solo o mezclas de Dioscorea Rhizoma y *Dioscorea nipponica* en otras proporciones en peso. El aumento del nivel de NGF en la glándula salival, que funciona como una fuente de NGF, significa potenciar la síntesis de NGF.

Por consiguiente, el extracto de hierbas de una mezcla de Dioscorea Rhizoma:*Dioscorea nipponica* a 3,5:1 (p/p) puede aumentar significativamente el nivel de NGF *in vivo*.

Por lo tanto, gracias a su capacidad de aumentar significativamente el nivel de NGF *in vivo*, el extracto de hierbas de una mezcla de Dioscorea Rhizoma:*Dioscorea nipponica* a 3,5:1 (p/p) de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a una composición farmacéutica o a un alimento funcional para la salud para la prevención y el tratamiento de la neuropatía periférica diabética.

EJEMPLO DE ENSAYO 2: Ensayo de los efectos sobre el dolor, la secreción de NGF y la neurodegeneración en ratas macho SD con diabetes de tipo 1 inducida por estreptozotocina

Se evaluaron el extracto de hierbas de una mezcla de Dioscorea Rhizoma:*Dioscorea nipponica* a 3,5:1, preparada en el Ejemplo 1, y los extractos de los Ejemplos comparativos 1 a 10 para determinar los efectos sobre el dolor, el nivel de NGF *in vivo* y la neurodegeneración en ratas macho SD con diabetes de tipo 1.

Se aclimataron ratas macho SD, cada una con un peso de 220~250 g, durante una semana a 22-24 °C a una humedad relativa del 60-80 % con una dieta convencional y agua suministrada en la misma. A partir de entonces, se administró por vía intravenosa una solución de estreptozotocina en solución salina una vez a una dosis de 50 mg/kg a las ratas para inducir la diabetes de tipo 1. Cuatro semanas después de la inducción de la diabetes, las ratas se dividieron en grupos según el nivel de azúcar en sangre. Se administraron los extractos preparados en los ejemplos anteriores por vía oral una vez al día durante 8 semanas a dosis predeterminadas a las ratas, mientras que el ácido  $\alpha$ -lipoico y la gabapentina se usaron como controles positivos a dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg, respectivamente. A continuación, se sacrificaron para extraer el nervio ciático y las glándulas salivales. El nervio ciático y las glándulas salivales se procesaron de la misma manera que en el Ejemplo de ensayo 1 y se midieron para determinar el nivel de NGF mediante ELISA. Los resultados se resumen en la Tabla 7 que se presenta a continuación.

Se examinó la capacidad de los extractos para aliviar el dolor causado por la neuropatía diabética. En este sentido, se separaron las ratas con diabetes inducida por estreptozotocina y recibieron por vía oral los extractos a una dosis predeterminada una vez al día durante 14 semanas, con 50 mg/kg de ácido  $\alpha$ -lipoico y 100 mg/kg de gabapentina

como controles positivos. Se realizó un ensayo de Randall-Sellito para medir un umbral de respuesta a la presión sobre una pata. Se midió el tiempo de latencia adoptado para responder a un dolor térmico usando un ensayo de retirada de la cola. Los resultados se resumen en la Tabla 8. Con el fin de evaluar la neurodegeneración que había progresado con el comienzo de la neuropatía diabética, se fijó el nervio ciático extraído de las ratas de cada grupo con formalina y se observó bajo un microscopio electrónico para medir el tamaño y el espesor de la vaina de mielina, y los resultados se resumen en la Tabla 9.

Tabla 7

[Tabla 7]

Nivel de NGF en el nervio ciático de modelo de rata con diabetes de tipo 2 (rata macho SD)						
Grupo	Cantidad de material (kg)		Proporción en peso de D. Rhizoma: <i>D. nipponica</i>	Dosis (mg/kg)	Nivel de NGF	
	D. Rhizoma	D. <i>nipponica</i>			Nervio ciático (pg/mg)	Glándula salival (ng/mg)
Normal					25,5	4,1
Control					11,9	2,1
Ej. 1	1,55	0,45	3,5:1	100	35,4	3,8
Ej. comp. 1	2	-	-	100	13,1	2,0
Ej. comp. 2	-	2	-	100	12,7	1,7
Ej. comp. 3	1	1	1:1	100	19,2	1,9
Ej. comp. 4	1,33	0,67	2:1	100	27,9	2,4
Ej. comp. 5	1,67	0,33	5:1	100	25,1	2,9
Ej. comp. 6	1,82	0,18	10:1	100	24,6	2,8
Ej. comp. 7	0,67	1,33	1:2	100	19,1	3,3
Ej. comp. 8	0,45	1,55	1:3,5	100	19,8	2,9
Ej. comp. 9	0,33	1,67	15	100	20,9	2,9
Ej. comp. 10	0,18	1,82	1:10	100	16,4	2,5
Ácido $\alpha$ -lipoico				50	13,8	2,8
Gabapentina				100	14,9	2,4

Cuando se administran a la misma dosis, como puede observarse en la Tabla 7, el extracto del Ejemplo 1 aumentó significativamente el nivel de NGF, tanto en el nervio ciático como en la glándula salival, en comparación con el extracto de *Dioscorea Rhizoma* del Ejemplo comparativo 1, el extracto de *Dioscorea nipponica* del Ejemplo comparativo 2 o los extractos de mezclas de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* de los Ejemplos comparativos 3 a 10.

Por lo tanto, se probó la inducción del extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma*:*Dioscorea nipponica* a 3,5:1 de un aumento significativo de NGF en los tejidos diana (nervio ciático, glándula salivar), incluso en animales con diabetes de tipo 1.

Tabla 8

[Tabla 8]

Ensayo para determinar la respuesta al dolor en modelo de rata con diabetes de tipo 1 (rata macho SD)						
	Cantidad de material (kg)		Proporción en peso de D. Rhizoma: <i>D. nipponica</i>	Dosis (mg/kg)	Umbral de dolor a la presión (g)	Tiempo de latencia de la reacción al dolor (s)
	D. Rhizoma	D. <i>nipponica</i>				
Normal					270.0	9.9
Control					128,8	5.4
Ej. 1	1.55	0.45	3.5: 1	100	191,7	11.4

Ensayo para determinar la respuesta al dolor en modelo de rata con diabetes de tipo 1 (rata macho SD)						
	Cantidad de material (kg)		Proporción en peso de D. Rhizoma: <i>D. nipponica</i>	Dosis (mg/kg)	Umbral de dolor a la presión (g)	Tiempo de latencia de la reacción al dolor (s)
	D. Rhizoma	D. <i>nipponica</i>				
Ej. comp. 1	2	-	-	100	130,1	6,3
Ej. comp. 2	-	2	-	100	129,8	6,7
Ej. comp. 3	1	1	1:1	100	169,0	8,0
Ej. comp. 4	1,33	0,67	2:1	100	163,7	7,8
Ej. comp. 5	1,67	0,33	5:1	100	138,0	7,4
Ej. comp. 6	1,82	0,18	10:1	100	150,0	7,2
Ej. comp. 7	0,67	1,33	1:2	100	153,5	7,9
Ej. comp. 8	0,45	1,55	1:3,5	100	157,0	7,6
Ej. comp. 9	0,33	1,67	15	100	157,6	7,1
Ej. comp. 10	0,18	1,82	1:10	100	129,2	7,5
Ácido $\alpha$ -lipoico				50	150,0	7,4
Gabapentina				100	137,7	7,7

Como se puede observar en la Tabla 8, cuando se administran a la misma dosis, el extracto del Ejemplo 1 aumentó significativamente tanto el umbral de dolor a la presión como el tiempo de latencia de respuestas a la presión, en comparación con el extracto de *Dioscorea Rhizoma* del Ejemplo comparativo 1, el extracto de *Dioscorea nipponica* del Ejemplo comparativo 2 o los extractos de mezclas de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* de los Ejemplos comparativos 3 a 10.

Un aumento del umbral de los estímulos mecánicos define un aumento del umbral de dolor. En el ensayo de retirada de la cola, un aumento del tiempo de latencia para la respuesta al dolor se corresponde con un aumento del umbral de estímulos térmicos, lo que indica el alivio del dolor.

Por lo tanto, el extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma*:*Dioscorea nipponica* 3,5:1 de acuerdo con la presente invención presenta un efecto significativo de alivio del dolor, un síntoma de la neuropatía periférica diabética.

Tabla 9

[Tabla 9]

Ensayo para la neurodegeneración en modelo de rata con diabetes de tipo 1 (rata macho SD)			
	Dosis (mg/kg)	Neurodegeneración	
		Tamaño de la vaina de mielina ( $\mu\text{m}$ )	Espesor de la vaina de mielina ( $\mu\text{m}$ )
Normal		15,3	3,2
Control		9,3	2,5
Ej. 1	30	13,6	3,2
	100	13,8	2,9
Ácido $\alpha$ -lipoico	50	11,2	2,6
Gabapentina	100	10,4	2,2

Como resulta evidente a partir de los datos de la Tabla 9, tanto el tamaño como el grosor de la vaina de mielina del control se redujo, lo que indica el daño o la degeneración del nervio ciático debido a la neuropatía diabética. Cuando se administró con el extracto del Ejemplo 1, se observó que tanto el tamaño como el grosor de la vaina de mielina de las ratas habían crecido.

Por lo tanto, el extracto de la presente invención puede mejorar la neurodegeneración, dando lugar a la regeneración nerviosa en los órganos diana, incluso en un aspecto histológico.

5 Por consiguiente, el extracto de hierbas de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a una composición farmacéutica que puede dar lugar a un efecto sinérgico significativo en la prevención y el tratamiento de la neuropatía periférica diabética en sujetos con diabetes de tipo 1.

EJEMPLO DE ENSAYO 3: Ensayo de los efectos sobre el dolor, la secreción de NGF y la neurodegeneración en ratones ICR macho con diabetes de tipo 1 inducida por estreptozotocina

10 Se evaluó el extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma: Dioscorea nipponica* a 3,5:1, preparado en el Ejemplo 1, para determinar los efectos sobre el dolor, el nivel de NGF *in vivo* y la neurodegeneración en ratones ICR macho con diabetes de tipo 1.

15 Se aclimataron los ratones ICR macho, cada uno con un peso de 25~30 g, durante una semana a 22-24 °C a una humedad relativa del 60-80 % con una dieta convencional y agua suministrada en la misma. A partir de entonces, se administró por vía intravenosa una solución de estreptozotocina en solución salina una vez a una dosis de 200 mg/kg a los ratones para inducir la diabetes de tipo 1. Cuatro semanas después de la inducción de la diabetes, los ratones se dividieron en grupos según el nivel de azúcar en sangre. Se administraron los extractos preparados en los ejemplos anteriores por vía oral una vez al día durante 14 semanas a dosis predeterminadas a los ratones, mientras que el ácido  $\alpha$ -lipoico y la gabapentina se usaron como controles positivos a dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg, respectivamente. Se dispusieron los ratones de cada grupo sobre una placa caliente a 58 °C y se examinaron para determinar la hiperplasia ante estímulos de calor, midiendo el tiempo de latencia que tardaron los ratones en sentir dolor por calor en la planta de las patas y saltar. Los resultados se resumen en la Tabla 10.

25 A continuación, los ratones se sacrificaron para extraer el nervio ciático y las glándulas salivales de los mismos. El nervio ciático y las glándulas salivales se procesaron de la misma manera que en el Ejemplo de ensayo 1 y se midió el nivel de NGF mediante ELISA. Los resultados se resumen en la Tabla 11 que se presenta a continuación.

30 Con el fin de evaluar la neurodegeneración que había progresado con el comienzo de la neuropatía diabética, se fijó el nervio ciático extraído de los ratones de cada grupo con formalina y se observó bajo un microscopio electrónico para medir el tamaño y el grosor de la vaina de mielina, y los resultados se resumen en la Tabla 12.

Tabla 10

35

[Tabla 10]

Ensayo para la respuesta al dolor en modelo de ratón con diabetes de tipo 1 (ratones ICR macho)		
Grupo	Dosis (mg/kg)	Tiempo de latencia hasta la respuesta al dolor en placa caliente a 58 °C (s)
Normal		55,3
Control		25,2
Ej. 1	100	45,9
Ej. comp. 1	100	26,6
Ej. comp. 2	100	25,7
Ej. comp. 3	100	35,6
Ej. comp. 4	100	25,3
Ej. comp. 5	100	26,0
Ej. comp. 6	100	35,0
Ej. comp. 7	100	32,2
Ej. comp. 8	100	33,0
Ej. comp. 9	100	26,8
Ej. comp. 10	100	36,1
Ácido $\alpha$ -lipoico	50	31,1
Gabapentina	100	33,0

Un aumento del tiempo de latencia hasta la respuesta al dolor en la placa caliente refleja un aumento del umbral del dolor a los estímulos térmicos, lo que indica una reducción del dolor. Como se puede observar en la Tabla 10, el

extracto del Ejemplo 1 aumentó significativamente el tiempo de latencia hasta la respuesta al dolor en una placa caliente, en comparación con el extracto de *Dioscorea Rhizoma* del Ejemplo comparativo 1, el extracto de *Dioscorea nipponica* del Ejemplo comparativo 2 o los extractos de mezclas de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* de los Ejemplos comparativos 3 a 10, lo que demuestra que la composición de hierbas de la presente invención tiene un efecto significativo de alivio del dolor, un síntoma de la neuropatía periférica diabética.

Tabla 11

[Tabla 11]

Niveles de NGF en el nervio ciático y la glándula salival en modelo de ratón con diabetes de tipo 1 (ratones ICR macho)			
Grupo	Dosis (mg/kg)	Nivel de NGF	
		Nervio ciático (pg/mg)	Glándula salival (ng/mg)
Normal		9,7	226,1
Control		3,9	101,8
Ej. 1	100	9,2	169,6
Ej. comp. 1	100	4,1	107,2
Ej. comp. 2	100	3,9	104,3
Ej. comp. 3	100	6,2	118,7
Ej. comp. 4	100	4,8	115,8
Ej. comp. 5	100	4,0	121,0
Ej. comp. 6	100	3,6	114,3
Ej. comp. 7	100	6,2	122,7
Ej. comp. 8	100	4,8	104 0,7
Ej. comp. 9	100	4,1	104,7
Ej. comp. 10	100	3,5	120,4
Ácido $\alpha$ -lipoico	50	5,7	118,7
Gabapentina	100	5,5	117,1

Como se puede observar en la Tabla 11, el extracto del Ejemplo 1 aumentó significativamente el nivel de NGF, tanto en el nervio ciático como en la glándula salival, en comparación con el extracto de *Dioscorea Rhizoma* del Ejemplo comparativo 1, el extracto de *Dioscorea nipponica* del Ejemplo comparativo 2 o los extractos de mezclas de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* de los Ejemplos comparativos 3 a 10.

Por lo tanto, el extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma*:*Dioscorea nipponica* a 3,5:1 ha demostrado inducir un aumento significativo de NGF en los órganos diana (nervio ciático, glándula salival) en ratones macho ICR con diabetes de tipo 1, así como en ratas macho SD con diabetes de tipo 1.

Tabla 12

[Tabla 12]

Ensayo para la neurodegeneración en modelo de ratón con diabetes de tipo 1 (ratones ICR macho)			
Grupo	Dosis (mg/kg)	Neurodegeneración	
		Tamaño de la vaina de mielina ( $\mu$ m)	Espesor de la vaina de mielina ( $\mu$ m)
Normal		14,3	3,4
Control		9,1	2,0
Ej. 1	30	13,7	2,9
	100	12,9	2,6

Como resulta evidente a partir de los datos de la Tabla 12, la vaina de mielina del control se redujo tanto en tamaño como en espesor, lo que indica el daño o la degeneración del nervio ciático debido a la neuropatía diabética. Cuando recibieron el extracto del Ejemplo 1, se observó que los ratones tenían una vaina de mielina que aumentó tanto en tamaño como en espesor.

Por lo tanto, el extracto de la presente invención puede mejorar la neurodegeneración en ratones ICR con diabetes de tipo 1, así como en ratas SD con diabetes de tipo 1, dando lugar a la regeneración nerviosa de los órganos diana, incluso en un aspecto histológico.

- 5 Por consiguiente, el extracto de hierbas de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a una composición farmacéutica que puede dar lugar a un efecto sinérgico significativo sobre la prevención y el tratamiento de la neuropatía periférica diabética en sujetos con diabetes de tipo 1.

10 EJEMPLO DE ENSAYO 4: Ensayo de los efectos sobre el dolor y la secreción de NGF en ratones macho con diabetes de tipo 2 inducida genéticamente (ratones macho db/db)

15 Se evaluó el extracto de hierbas de una mezcla de Dioscorea Rhizoma: *Dioscorea nipponica* a 3,5:1, preparado en el Ejemplo 1, para determinar los efectos sobre el dolor y el nivel de NGF *in vivo* en ratones macho db/db con diabetes de tipo 2.

20 Se aclimataron los ratones macho db/db, cada uno con un peso de 40~45 g, durante una semana a 22-24 °C a una humedad relativa del 60-80 % con una dieta convencional y agua suministrada en la misma. El día que cumplían 9 semanas de vida, se seleccionaron los ratones en los que se había inducido la diabetes. Cuatro semanas después, los ratones que padecían diabetes de tipo 2 se separaron según el nivel de azúcar en sangre. Se administraron los extractos preparados en los ejemplos anteriores por vía oral una vez al día durante 12 semanas a dosis predeterminadas a los ratones, mientras que el ácido  $\alpha$ -lipoico y la gabapentina se usaron como controles positivos a dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg, respectivamente. Se dispusieron los ratones de cada grupo sobre una placa caliente a 58 °C y se examinaron para determinar la hiperplasia ante estímulos de calor, midiendo el tiempo de latencia que tardaron los ratones en sentir dolor por calor en la planta de las patas y saltar. Los resultados se resumen en la

25 Tabla 13.

30 A continuación, los ratones se sacrificaron para extraer el nervio ciático de los mismos. El nervio ciático se procesó de la misma manera que en el Ejemplo de ensayo 1 y se midió el nivel de NGF mediante ELISA. Los resultados se resumen en la Tabla 14 que se presenta a continuación.

Tabla 13

[Tabla 13]

Ensayo para la respuesta al dolor en modelo de ratón con diabetes de tipo 2 (ratón macho db/db)		
Grupo	Dosis (mg/kg)	Tiempo de latencia hasta la respuesta al dolor en placa caliente a 58 °C (s)
Control		12,7
Ej. 1	100	28,0
Ej. comp. 1	100	15,1
Ej. comp. 2	100	14,9
Ej. comp. 3	100	21,3
Ej. comp. 4	100	21,0
Ej. comp. 5	100	20,5
Ej. comp. 6	100	19,3
Ej. comp. 7	100	22,3
Ej. comp. 8	100	17,6
Ej. comp. 9	100	17,6
Ej. comp. 10	100	16,8
Ácido $\alpha$ -lipoico	50	15,4
Gabapentina	100	16,1

- 35 Como se puede observar en la Tabla 13, el extracto del Ejemplo 1 aumentó significativamente el tiempo de latencia hasta la respuesta al dolor en una placa caliente, en comparación con el extracto de Dioscorea Rhizoma del Ejemplo comparativo 1, el extracto de *Dioscorea nipponica* del Ejemplo comparativo 2 o los extractos de mezclas de Dioscorea Rhizoma y *Dioscorea nipponica* de los Ejemplos comparativos 3 a 10, lo que demuestra que la composición de hierbas de la presente invención tiene un efecto significativo de alivio del dolor, un síntoma de la neuropatía periférica diabética.
- 40

Tabla 14

[Tabla 14]

Nivel de NGF en el nervio ciático en modelo de ratón con diabetes de tipo 2 (ratón macho db/db)		
Grupo	Dosis (mg/kg)	Nivel de NGF en el nervio ciático (pg/mg)
Control		6,2
Ej. 1	100	11,6
Ej. comp. 1	100	6,5
Ej. comp. 2	100	6,3
Ej. comp. 3	100	8,4
Ej. comp. 4	100	8,3
Ej. comp. 5	100	7,8
Ej. comp. 6	100	6,9
Ej. comp. 7	100	8,1
Ej. comp. 8	100	7,0
Ej. comp. 9	100	7,1
Ej. comp. 10	100	7,3
Ácido $\alpha$ -lipoico	50	7,6
Gabapentina	100	7,2

5 Como se puede observar en la Tabla 14, el extracto del Ejemplo 1 aumentó significativamente el nivel de NGF en el nervio ciático en comparación con el extracto de *Dioscorea Rhizoma* del Ejemplo comparativo 1, el extracto de *Dioscorea nipponica* del Ejemplo comparativo 2 o los extractos de mezclas de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* de los Ejemplos comparativos 3 a 10.

10 Por lo tanto, el extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma*:*Dioscorea nipponica* a 3,5:1 ha demostrado inducir un aumento significativo de NGF en el órgano diana en condiciones de diabetes de tipo 2.

15 Teniendo la capacidad de aumentar significativamente los niveles de NGF *in vivo*, el extracto de hierbas de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a una composición farmacéutica que puede dar lugar a un efecto sinérgico significativo en la prevención y el tratamiento de la neuropatía periférica diabética en sujetos con diabetes de tipo 1 o 2.

20 EJEMPLO DE ENSAYO 5: Ensayo de la actividad de inducción de la síntesis de NGF y del crecimiento de las células nerviosas usando células de glioma de rata C6 y células nerviosas PC 12

Se examinó la capacidad del extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma*:*Dioscorea nipponica* a 3,5:1 (p/p), preparado en el Ejemplo 1, para inducir la síntesis de NGF en células de glioma de rata C6 y el crecimiento de células nerviosas PC 12 de rata.

25 Para evaluar la capacidad del extracto para inducir la síntesis de NGF, se sembraron células de glioma C6 a la misma densidad por pocillo en placas y se incubaron durante 24 horas. Las células se lavaron con PBS, y se cultivaron durante 48 horas en medio de cultivo recién preparado complementado con 50  $\mu$ g/ml o 250  $\mu$ g/ml de extractos de hierbas del Ejemplo 1 o los Ejemplos comparativos 1 a 10. A continuación, se recogieron los medios de cultivo y se analizaron cuantitativamente los niveles de NGF usando ELISA. Los resultados se resumen en la Tabla 15.

35 Para el uso en ensayo de la capacidad para inducir el crecimiento de células nerviosas, se sembraron células nerviosas PC 12 a la misma densidad por pocillo en placas y se incubaron durante 24 horas. Las células se lavaron con PBS y se cultivaron durante 48 horas en medio de cultivo suplementado con los extractos de hierbas del Ejemplo 1 o los Ejemplos comparativos 1 a 10 o NGF. El crecimiento de las células se midió usando el ensayo de MTS, y los resultados se resumen en la Tabla 16.

Tabla 15

[Tabla 15]

Efecto potenciador de la síntesis de NGF		
Grupo	Dosis (µg/ml)	Nivel de NGF (% de control)
Control		100
Ej. 1	50	113
	250	149
Ej. comp. 1	50	-
	250	107
Ej. comp. 2	50	-
	250	103
Ej. comp. 3	50	108
	250	110
Ej. comp. 4	50	102
	250	105
Ej. comp. 5	50	101
	250	110
Ej. comp. 6	50	105
	250	111
Ej. comp. 7	50	102
	250	122
Ej. comp. 8	50	107
	250	128
Ej. comp. 9	50	104
	250	119
Ej. comp. 10	50	101
	250	123

5 Como se puede observar en la Tabla 15, el extracto del Ejemplo 1 aumentó significativamente el nivel de NGF en las células C6, en comparación con el extracto del Ejemplo comparativo 1 (de *Dioscorea Rhizoma* solo), el extracto del Ejemplo comparativo 2 (de *Dioscorea nipponica* solo) o los extractos de los Ejemplos comparativos 3 a 10 (de mezclas de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en otras proporciones en peso).

10 Por lo tanto, el extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma*:*Dioscorea nipponica* a 3,5:1 ha demostrado inducir al máximo la síntesis de NGF.

Tabla 16

15

[Tabla 16]

Efecto proliferativo sobre las células nerviosas		
Grupo	Dosis (µg/ml)	Efecto sobre la proliferación de la célula nerviosa (% del control)
Control		100
NGF	2 (ng/ml)	112
	50 (ng/ml)	118
Ej. 1	1	111
	30	117
Ej. comp.	1	-

Efecto proliferativo sobre las células nerviosas		
Grupo	Dosis (µg/ml)	Efecto sobre la proliferación de la célula nerviosa (% del control)
1	30	101
Ej. comp. 2	1	-
	30	100
Ej. comp. 3	1	101
	30	105
Ej. comp. 4	1	98
	30	103
Ej. comp. 5	1	100
	30	101
Ej. comp. 6	1	99
	30	102
Ej. comp. 7	50	104
	250	106
Ej. comp. 8	50	100
	250	103
Ej. comp. 9	50	99
	250	101
Ej. comp. 10	50	104
	250	102

5 Como se puede observar en la Tabla 16, el extracto del Ejemplo 1 potenció significativamente el crecimiento de las células nerviosas PC 12, en comparación con el extracto del Ejemplo comparativo 1 (de *Dioscorea Rhizoma* solo), el extracto del Ejemplo comparativo 2 (de *Dioscorea nipponica* solo) o los extractos de los Ejemplos comparativos 3 a 10 (de mezclas de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en otras proporciones en peso).

Por lo tanto, el extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma*:*Dioscorea nipponica* a 3,5:1 de acuerdo con la presente invención ha demostrado tener un efecto significativo sobre la proliferación de las células nerviosas.

#### 10 EJEMPLO DE ENSAYO 6: Ensayo de la fosforilación del receptor de NGF en células nerviosas PC 12

Se evaluó la capacidad del extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma*:*Dioscorea nipponica* a 3,5:1, preparado en el Ejemplo 1, para potenciar la fosforilación de los receptores de NGF en células nerviosas PC 12 de rata.

15 Para su uso en dicho ensayo, las células nerviosas PC 12 se sembraron a la misma densidad por pocillo en placas y se incubaron durante 24 horas. Las células se lavaron con PBS y se cultivaron durante 48 horas en medio de cultivo suplementado con los extractos de hierbas del Ejemplo 1 o los Ejemplos comparativos 1 a 10 o NGF. Tras ello, se detectaron TrkA fosforilados (receptor de NGF) usando transferencia Western, y se analizaron cuantitativamente basándose en el espesor de las bandas detectadas. Los resultados se resumen en la Tabla 17.

La señalización del NGF se inicia con la unión del NGF a su receptor (Trk-A), lo que resulta en la fosforilación del receptor. Por lo tanto, un mayor nivel de receptores fosforilados de NGF significa la amplificación de la vía de señalización de NGF.

25 Como resulta evidente a partir de los datos de la Tabla 17 que se presenta a continuación, el extracto del Ejemplo 1 indujo un aumento significativo de la fosforilación de los receptores de NGF, en comparación con el extracto del Ejemplo comparativo 1 (de *Dioscorea Rhizoma* solo), el extracto del Ejemplo comparativo 2 (de *Dioscorea nipponica* solo) o los extractos de los Ejemplos comparativos 3 a 10 (de mezclas de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* en otras proporciones en peso).

30

Tabla 17

[Tabla 17]

Efecto potenciador de la fosforilación del receptor de NGF			
Grupo	Dosis		Cantidad relativa de NGF fosforilado (% de control)
	NGF (ng/ml)	Extracto combinado (µg/ml)	
Control			100
NGF	2	-	241
	50	-	337
Ej. 1 + NGF	2	200	309
		500	389
Ej. comp. 1 + NGF	2	200	-
		500	232
Ej. comp. 2 + NGF	2	200	-
		500	229
Ej. comp. 3 + NGF	2	200	268
		500	299
Ej. comp. 4 + NGF	2	200	255
		500	287
Ej. comp. 5 + NGF	2	200	254
		500	274
Ej. comp. 6 + NGF	2	200	248
		500	277
Ej. comp. 7 + NGF	2	200	251
		500	268
Ej. comp. 8 + NGF	2	200	239
		500	287
Ej. comp. 9 + NGF	2	200	249
		500	296
Ej. comp. 10 + NGF	2	200	244
		500	280

5 EJEMPLO DE ENSAYO 7: Ensayo de la actividad de inducción del crecimiento de las neuritas en células nerviosas de DRG derivadas de rata

10 Se evaluó el extracto de hierbas de una mezcla de Dioscorea Rhizoma: *Dioscorea nipponica* a 3,5:1, preparado en el Ejemplo 1, para determinar la actividad de potenciación del crecimiento de las neuritas en células nerviosas de DRG (ganglio de la raíz dorsal) obtenidas de embriones de rata

15 Para su uso en dicho ensayo, las células nerviosas de DRG se sembraron a la misma densidad en placas y se incubaron durante 24 horas. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se cultivaron durante 48 horas en un medio de cultivo en ausencia o en presencia de una combinación del extracto del Ejemplo 1 o los Ejemplos comparativos 1 a 10, y NGF. Se observaron las células nerviosas de cada grupo bajo un microscopio para medir la superficie de neuritas desarrolladas en las mismas. En la Tabla 18, se dan los valores medios de las medidas.

20 Un aumento de la superficie de neuritas indica que las células nerviosas se activan para desarrollar neuritas. Como se puede observar en la Tabla 18 que se presenta a continuación, el extracto del Ejemplo 1 aumentó significativamente una superficie de neuritas, en comparación con el extracto del Ejemplo comparativo 1 (de Dioscorea Rhizoma solo), el extracto del Ejemplo comparativo 2 (de *Dioscorea nipponica* solo) o el extractos de los Ejemplos comparativos 3 a 10 (a partir de mezclas de Dioscorea Rhizoma y *Dioscorea nipponica* en otras proporciones en peso).

Tabla 18

[Tabla 18]

Efecto potenciador de la formación de neuritas de célula nerviosa de DRG			
Grupo	Dosis		Superficie de neuritas de célula nerviosa de DRG ( $\mu\text{m}^2$ )
	NGF (ng/ml)	Extracto combinado ( $\mu\text{g/ml}$ )	
Control			149
NGF	2	-	235
	50	-	461
Ej. 1 + NGF	2	30	291
		100	502
Ej. comp. 1 + NGF	2	30	-
		100	234
Ej. comp. 2 + NGF	2	30	-
		100	236
Ej. comp. 3 + NGF	2	30	264
		100	288
Ej. comp. 4 + NGF	2	30	259
		100	271
Ej. comp. 5 + NGF	2	30	241
		100	294
Ej. comp. 6 + NGF	2	30	232
		100	301
Ej. comp. 7 + NGF	2	30	269
		100	288
Ej. comp. 8 + NGF	2	30	257
		100	279
Ej. comp. 9 + NGF	2	30	241
		100	266
Ej. comp. 10 + NGF	2	30	239
		100	248

- 5 En conjunto, los datos obtenidos de los Ejemplos de ensayo 1 a 7 demuestran que el extracto del Ejemplo 1 puede inducir significativamente la elevación de los niveles de NGF *in vivo*, el crecimiento de las células nerviosas y las neuritas, el alivio del dolor, un síntoma de la neuropatía diabética, y la prevención de la neurodegeneración histológica (la potenciación de la regeneración nerviosa), en comparación con el extracto del Ejemplo comparativo 1 (de *Dioscorea Rhizoma* solo), el extracto del Ejemplo comparativo 2 (de *Dioscorea nipponica* solo) o los extractos de
- 10 los Ejemplos comparativos 3 a 10 (de mezclas de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica* a otras proporciones en peso) y, por lo tanto, se pueden aplicar a composiciones farmacéuticas y a alimentos saludables para la prevención y el tratamiento de la neuropatía periférica diabética.

15 A continuación, se dará una descripción de ejemplos ilustrativos, no limitantes, de formulaciones que contienen el extracto de hierbas de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma* y *Dioscorea nipponica*.

#### Ejemplo de formulación 1. Preparación de inyección

Extracto del Ejemplo 1	100 mg
Metabisulfito de sodio	3,0 mg
Metilparabeno	0,8 mg

Propilparabeno	0,1 mg
Agua estéril para inyección	cs

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

5 EJEMPLO DE FORMULACIÓN 2: Preparación de comprimido

Extracto del Ejemplo 1	200 mg
Lactosa	100 mg
Almidón	100 mg
Estearato de Mg	cs

Se mezclaron los ingredientes y se comprimieron en un comprimido usando un método de formación de comprimidos.

10

EJEMPLO DE FORMULACIÓN 3: Preparación de cápsula

Extracto del Ejemplo 1	100 mg
Lactosa	50 mg
Almidón	50 mg
Talco	2 mg
Estearato de Mg	cs

Se mezclaron los ingredientes y se introdujeron en una cápsula de gelatina de acuerdo con un método típico de producción de una cápsula.

15

EJEMPLO DE FORMULACIÓN 4: Preparación de líquido

Extracto del Ejemplo 1	1.000 mg
Azúcar	20 g
Isomerasa	20 g
Aroma de limón	cs

20 Se añadió agua purificada hasta formar un volumen total de 100 ml

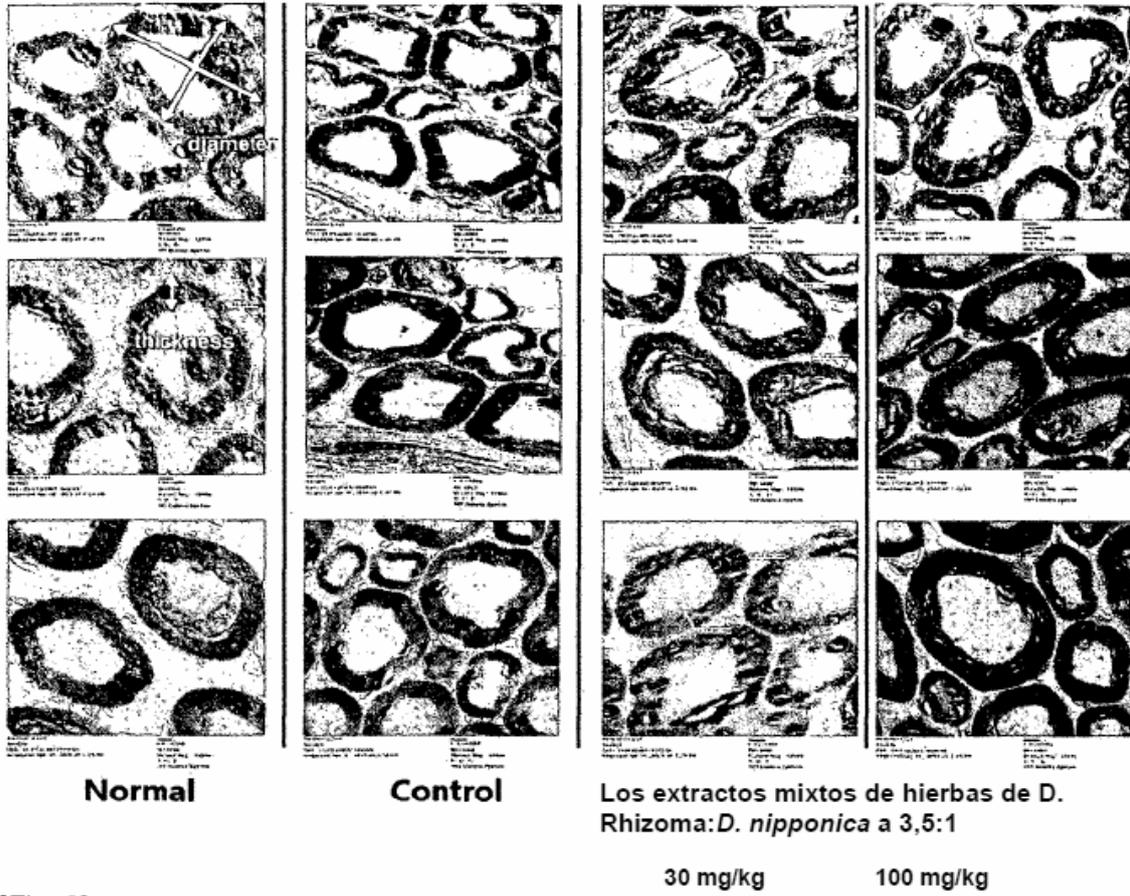
Se mezclaron los ingredientes anteriores, se introdujeron en un vial de color marrón de 100 ml y se esterizaron, obteniéndose una formulación líquida.

25 Aunque se han desvelado las realizaciones preferidas de la presente invención con fines ilustrativos, los expertos en la materia apreciarán que son posibles diversas modificaciones, adiciones y sustituciones, sin apartarse del alcance ni del espíritu de la invención según lo desvelado en las reivindicaciones que se adjuntan.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de la neuropatía periférica diabética, que comprende un extracto de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* a 3,5:1 (p/p) como un principio activo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que *Dioscorea Rhizoma* es un rizoma fresco de *Dioscorea batatas* Decaisne o *Dioscorea japonica* Thunberg, o un rizoma fresco de *Dioscorea batatas* Decaisne o *Dioscorea japonica* Thunberg que se ha cocido al vapor y se ha secado.
- 10 2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la neuropatía periférica diabética es una enfermedad desarrollada por al menos una causa seleccionada del grupo que consiste en distrofia, degeneración y apoptosis de las células nerviosas.
- 15 3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la neuropatía periférica diabética muestra un síntoma seleccionado del grupo que consiste en una sensación de quemazón, un dolor punzante, molestias, una sensación de malestar, pérdida de la sensación táctil, sensación vibratoria o sensación de temperatura, y una combinación de las mismas.
- 20 4. Un alimento funcional para la salud para su uso en la prevención o en la mejora de la neuropatía periférica diabética, que comprende un extracto de una mezcla de *Dioscorea Rhizoma:Dioscorea nipponica* a 3,5:1 (p/p), en el que *Dioscorea Rhizoma* es un rizoma fresco de *Dioscorea batatas* Decaisne o *Dioscorea japonica* Thunberg, o un rizoma fresco de *Dioscorea batatas* Decaisne o *Dioscorea japonica* Thunberg que se ha cocido al vapor y se ha secado.
- 25 5. La composición de alimento funcional para la salud para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el extracto se prepara en una forma seleccionada del grupo que consiste en un polvo, un gránulo, un comprimido, una cápsula, un jarabe y una bebida.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

