

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 227**

51 Int. Cl.:

A23L 33/105 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2006 PCT/KR2006/004408**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2007 WO07049932**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2006 E 06812249 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 1942920**

54 Título: **Extracto de la familia Dioscoreaceae y composición que lo comprende para prevenir o tratar neuropatía periférica**

30 Prioridad:

28.10.2005 KR 20050102450

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

27.09.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP
OF KYUNG HEE UNIVERSITY (100.0%)
1732, Deogyong-daero, Giheung-gu, Yongin-si
Gyeonggi-do 17104, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SUN-YEOU;
KANG, TONG-HO y
PARK, JI-HO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 634 227 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

Extracto de la familia *Dioscoreaceae* y composición que lo comprende para prevenir o tratar neuropatía periférica

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un extracto de la familia *Dioscoreaceae* para el tratamiento de la neuropatía periférica; y a una composición farmacéutica o composición alimentaria que comprende el extracto o un compuesto asilado del extracto.

Antecedentes en la técnica

10 La neuropatía es una enfermedad causada por anomalías estructurales o funcionales del sistema nervioso. El sistema nervioso se divide en el sistema nervioso central, que se distribuye en el cerebro y la médula espinal y que está relacionado con el control de sus funciones, y el sistema nervioso periférico, que se distribuye por prácticamente todos los órganos excluyendo el cerebro y la médula espinal, y que está relacionado con el control de sus funciones. El sistema nervioso periférico se subdivide en el sistema nervioso motor, el sistema nervioso sensorial, el sistema nervioso autónomo. Los nervios periféricos, en los que se ramifican las neuritas extendiéndose más allá del cerebro y la médula espinal hacia el cuerpo, los brazos y las piernas, transmiten las sensaciones sentidas en los brazos y las piernas al nervio central (cerebro y médula espinal) y transmite órdenes del nervio central a los músculos.

15 El nervio periférico se puede dañar por diversas causas, que reciben el nombre global de neuropatía periférica. La mono-neuropatía se refiere al caso en el que se daña un solo nervio periférico y neuropatía múltiple se refiere al caso en el que se dañan muchos nervios periféricos a un nivel similar. La mono-neuropatía tiene lugar normalmente cuando se presiona o se produce una lesión traumática de un nervio periférico de una forma anormal extendiéndose a las terminaciones de los brazos y las piernas. La mono-neuropatía se puede tratar con operaciones.

20 La neuropatía múltiple puede producirse por diversas causas, tales como enfermedad metabólica (p.ej. diabetes, insuficiencia renal, hipotiroidismo), fármacos (p.ej., agentes antitumorales, fármacos antituberculosos) o intoxicación por sustancias tóxicas (p.ej., Pb, disolventes orgánicos), malnutrición (p.ej., deficiencia vitamínica, alcoholismo), trastornos del tejido conectivo (p.ej. artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico), enfermedades inflamatorias (síndrome de Guillain-Barre) o neuropatía genéticamente determinada. Asimismo, la neuropatía múltiple puede ser causada por cánceres.

25 Hasta ahora, la neuropatía se ha tratado con fármacos utilizados como terapia sintomática que solo mejora los síntomas y prácticamente no existen remedios fundamentales para la neuropatía. Únicamente epalrestat, un inhibidor de aldosa reductasa, ha sido aprobado por la Food and Drugs Administration de Estados Unidos (FDA), en lo que se refiere a la neuropatía periférica diabética, una de las neuropatías múltiples, pero epalrestat no se utiliza debido a sus bajos efectos terapéuticos (Foster DW., Harrison's Principles of Internal Medicine 13, p1979, 1999; Stephen LD, Applied Therapeutics: the clinical use of drugs. 6, p48.1-48.62, 1996).

30 Al mismo tiempo, hay una proteína que afecta al crecimiento, a la diferenciación ya la supervivencia de las neuronas del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP) denominada globalmente factor neurotrófico (FN), que es uno de los factores de control neurológico que regula el crecimiento, la diferenciación y la muerte de las neuronas. Entre los ejemplos de FN se incluyen, el factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), la neurotrofina-3 (NT-3), NT-4 y NT-5. Dichos FN se sintetizan en diferentes áreas y tienen diferente diferenciación, diferente expresión y diferentes regiones diana.

35 El factor del crecimiento nervioso (FCN), uno de los FN, inhibe la degeneración y la muerte de las neuronas de modo que previene una disminución del número de neuronas, protege a las neuronas de los daños y retiene fuentes neuronales maduras (Hefti F., J. Neurosci., 6(8), pp2155-2162, 1986; and Levi-Montalcini R., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 46, pp384-391, 1960). Se sabe que cuando el sistema nervioso se desarrolla normalmente, aproximadamente un 50 % de las neuronas en crecimiento se eliminan por muerte celular (Raff MC., y col., Science, 262(5134), pp. 695-70, 1993) y que el FCN secretado por una célula diana determina la supervivencia de neuronas. Para que las neuronas sobrevivan, crezcan y se diferencien en un estado normal, es indispensable un factor de crecimiento como FCN.

40 Dicha viabilidad del FCN ha llevado al desarrollo de un factor de crecimiento de nervio humano recombinante para tratar neuropatía diabética, una de las neuropatías múltiples. Sin embargo, el factor de crecimiento del nervio humano recombinante sigue siendo insatisfactorio en cuanto a su seguridad y eficacia (Apfel SC y col., Journal of American Medical Association 284(17), pp2215-2221, 2000). El documento CN1560061 desvela una saponina extraída de la herbácea china Huai Rhizoma Dioscoreae (*Dioscorea opposita*) con metanol suspendida en una solución en agua como primer disolvente y aplicando extracción desengrasante, utilizando butanol normal saturado con agua para la extracción. El compuesto puede actuar como el principal componente activo o como la principal materia prima para la preparación de medicinas para reducir el nivel de azúcar en sangre y curar el síndrome diabético.

Se han obtenido extractos de las partes aéreas de *Dioscorea opposita* (nombre alternativo: *Dioscorea batatas*) utilizando etanol y n-butanol como disolventes. Se han descrito las propiedades neuroprotectoras y antioxidantes de cuatro componentes identificados en estos extractos (Ma C y col., Journal of Natural Products 68(8), pp 1259-1261, 2005).

- 5 Goshajinki-gan es una hierba medicinal china tradicional compuesta de 10 derivados vegetales que incluyen rizoma deshidratado de *Dioscorea nipponica*, que contiene dioscina y diosgenina. No se ha descrito ningún principio activo aislado de esta medicina (Nishizawa M y col., Journal of the Neurological Sciences 132, 177-181, 1995).

Divulgación

Problema técnico

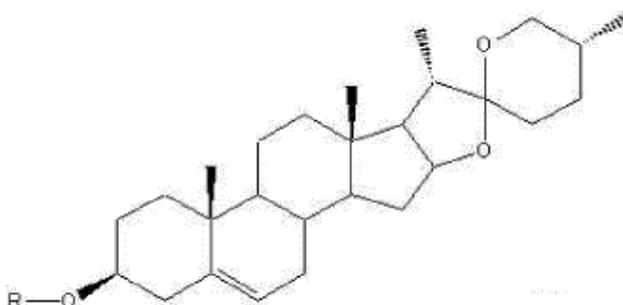
- 10 La presente invención proporciona extractos herbáceos y compuestos aislados de los mismos útiles para el tratamiento de neuropatía periférica provocada por varias causas.

Es decir, la presente invención proporciona un extracto de la familia *Dioscoreaceae* para el tratamiento de neuropatía periférica.

La presente invención proporciona asimismo una composición farmacéutica o un alimento.

- 15 De acuerdo con uno de los aspectos de la presente invención, se proporciona un extracto de la familia *Dioscoreaceae* para su uso en el tratamiento de neuropatía periférica, siendo la familia *Dioscoreaceae* al menos una especie seleccionada del grupo que consiste en *Dioscorea nipponica*, *Dioscorea septemloba*, *Dioscorea quinqueoloba*, *Dioscorea batatas*, *Dioscorea japonica*, *Dioscorea bulbifera*, *Dioscorea tokoro*, y *Dioscorea tenuipes*, en el que se obtiene el extracto realizando un procedimiento de extracción que comprende la extracción de una raíz de una especie de la familia *Dioscoreaceae* con un primer disolvente de extracción seleccionado del grupo que consiste en agua, alcohol de C₁-C₄, y una mezcla de agua y un alcohol de C₁-C₄, y en el que el extracto contiene un compuesto de Fórmula 1.
- 20

[Fórmula 1]



- 25 en la que R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de C₁-C₄ o un sacárido.

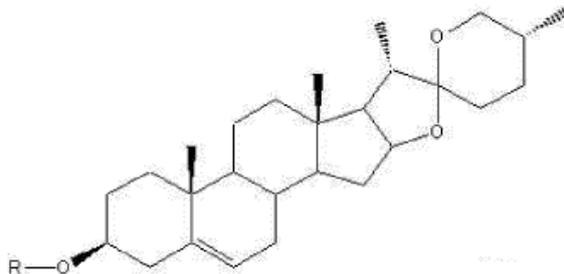
De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un producto alimentario funcional saludable para su uso en el tratamiento de neuropatía periférica que comprende un extracto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

- 30 En el presente documento se desvela una composición farmacéutica para prevenir o tratar neuropatía periférica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del extracto; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento se desvela una composición de alimento para prevenir o tratar neuropatía periférica, que comprende el extracto como principio activo.

- 35 En el presente documento se desvela una composición farmacéutica para prevenir o tratar neuropatía periférica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto representado por la Fórmula 1 o una sal del mismo; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[Fórmula 1]



en la que R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de C₁-C₄ o un sacárido.

5 En el presente documento se desvela una composición alimentaria para prevenir o tratar neuropatía periférica, que comprende el compuesto representado por la Fórmula 1 o una sal del mismo como principio activo.

Efectos ventajosos

Un extracto de la familia *Dioscoreaceae* y/o un compuesto aislado del extracto provoca un factor de crecimiento nervioso endógeno en un organismo de manera que se puede utilizar en una amplia gama de aplicaciones para tratar neuropatía periférica.

10 **Descripción de los dibujos**

Las FIG. 1 y FIG. 2 presentan el efecto del compuesto aislado de un extracto de acuerdo con una realización de la presente invención en la extensión de neuritis.

15 La FIG. 3 es un gráfico en el que se ilustra un cambio en el nivel de factor de crecimiento nervioso (FCN) en suero de ratón normal como resultado de la administración de un compuesto aislado de un extracto de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 4 es un gráfico en el que se ilustra un cambio en el nivel de un FCN en el suero de ratón en el que se ha inducido diabetes como resultado de la administración de un extracto de acuerdo con una realización de la presente invención y un compuesto aislado del extracto.

20 Las FIG. 5 y FIG. 6 ilustran el efecto de un compuesto aislado de un extracto de acuerdo con una realización de la presente invención en la velocidad de transmisión del nervio motor y el nervio sensorial en un nervio ciático de ratones en los que se ha inducido diabetes (FIG. 5: GD tratamiento durante un mes, FIG. 6: GD tratamiento durante dos meses)

25 La FIG. 7 es un gráfico en el que se ilustra un cambio en el nivel del FCN en el nervio ciático de ratones en los que se ha inducido diabetes como resultado de la administración de un compuesto aislado de un extracto de acuerdo con una realización de la presente invención.

La FIG. 8 es un gráfico en el que se ilustra un cambio en el nivel de sorbitol en el nervio ciático de un ratón en el que se ha inducido diabetes como resultado de la administración de un compuesto aislado de un extracto de acuerdo con una realización de la presente invención.

30 La FIG. 9 son imágenes que ilustran los cambios histológicos en el nervio ciático de ratón en el que se ha inducido diabetes como resultado de la administración de un extracto de acuerdo con una realización de la presente invención y un compuesto aislado del extracto

Mejor modo de realización

35 En la presente memoria descriptiva, el término "neuropatía periférica" se refiere a una afección de los nervios periféricos (nervios motores, nervios sensoriales y nervios autónomos), dañados por diversas causas. La neuropatía periférica se puede subdividir en mono-neuropatía y poli-neuropatía (también denominada neuropatía múltiple). La neuropatía múltiple incluye cualquier neuropatía causada por enfermedades metabólicas (p.ej. diabetes, insuficiencia renal, hipotiroidismo), fármacos (p.ej., agentes antitumorales, fármacos antituberculosos) o intoxicación por sustancias tóxicas (p.ej., Pb, disolventes orgánicos), malnutrición (p.ej., deficiencia vitamínica, alcoholismo), trastornos del tejido conectivo (p.ej. artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico), enfermedades inflamatorias

40 (síndrome de Guillain-Barre) o neuropatía genéticamente determinada. Asimismo, la neuropatía múltiple puede incluir una neuropatía causada por factores genéticos y cánceres.

45 Un extracto de la familia *Dioscoreaceae* de acuerdo con una realización de la presente invención o un compuesto aislado del extracto provoca la extensión de neuritis y aumenta la cantidad de factor de crecimiento nervioso endógeno secretado, de manera que los nervios del sistema nervioso periférico se pueden diferenciar, proteger y reinervar de forma eficaz. En particular, el extracto y/o compuesto permiten la administración oral, lo que favorece la observancia de la medicación por parte del paciente.

La presente invención proporciona un extracto de la familia *Dioscoreaceae* para tratar neuropatía periférica.

La especie de la familia *Dioscoreaceae* es al menos uno seleccionado entre *Dioscorea nipponica*, *Dioscorea septemloba*, *Dioscorea quinqueoloba*, *Dioscorea batatas*, *Dioscorea japonica*, *Dioscorea bulbifera*, *Dioscorea tokoro*, y *Dioscorea tenuipes*.

5 Preferentemente, la especie de la familia *Dioscoreaceae* es *Dioscorea nipponica*, *Dioscorea quinqueoloba*, y/o *Dioscorea tokoro*. Más preferentemente, la especie de la familia *Dioscoreaceae* es *Dioscorea nipponica*.

10 El extracto de acuerdo con la presente invención se puede obtener a través de un procedimiento de extracción que incluye la extracción de una parte entera, la raíz o la parte aérea (por ejemplo, la hoja o el tallo) de una especie de la familia *Dioscoreaceae* con un disolvente de extracción (primer disolvente de extracción) seleccionado del grupo que consiste en agua, alcohol de C₁-C₄, y una mezcla de agua y un alcohol de C₁-C₄. Por ejemplo, el extracto de la familia *Dioscoreaceae* se puede obtener extrayendo la raíz de una especie de la familia *Dioscoreaceae* con el primer disolvente de extracción. El primer disolvente de extracción puede ser un disolvente mixto de agua y metanol o un disolvente mixto de agua y etanol.

15 En el procedimiento de extracción, se corta en secciones pequeñas la parte entera, la raíz o la parte aérea, preferentemente la raíz de la especie de la familia *Dioscoreaceae* y a continuación, se extrae con el primer disolvente de extracción. En este momento, la cantidad del primer disolvente de extracción puede ser de 1 a 20 veces más, preferentemente de aproximadamente 3 a 10 veces más que la cantidad de la especie de la familia *Dioscoreaceae*. El primer disolvente de extracción puede ser un disolvente mixto de agua y metanol (por ejemplo, solución de metanol al 85 % aproximadamente) o un disolvente mixto de agua y etanol (por ejemplo, solución de etanol al 85 % aproximadamente). La extracción no se ve afectada por la temperatura y se puede llevar a cabo a varios intervalos de temperatura, por ejemplo una temperatura comprendida entre 15 °C y 100 °C. La extracción se puede llevar a cabo por extracción en frío, extracción en caliente, extracción superfluida, extracción centrífuga, extracción con ultrasonido o extracción con enfriamiento a reflujo. El período de extracción puede variar dependiendo del procedimiento de extracción. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la extracción una vez o varias veces durante aproximadamente 1 hora a 10 días. Preferentemente, la extracción se puede llevar a cabo dos veces o tres veces a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 días utilizando la primera extracción. El extracto obtenido por extracción con el primer disolvente de extracción puede presentar una forma líquida de la que se eliminan las impurezas en el extracto a través de un procedimiento convencional, p.ej. filtración o una forma en polvo obtenida por concentración a presión reducida o secado del extracto líquido utilizando un procedimiento convencional.

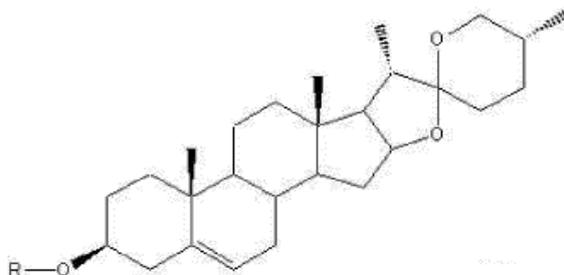
20 Por otra parte, cuando es necesario, el procedimiento de extracción puede incluir además la obtención de una fracción que tiene un mayor contenido de principios activos. Es decir, el procedimiento de extracción incluye además: dispersar el extracto obtenido a través de la extracción con el primer disolvente de extracción en agua; y extraer la solución resultante con alcohol C₁-C₄ saturado con agua (segundo disolvente de extracción), aumentando así el contenido de principios activos en el extracto obtenido.

25 Cuando se dispersa el extracto obtenido por extracción con el primer disolvente de extracción en agua, se puede dispersar en agua la forma líquida con la extracción con el primer disolvente de extracción de por sí o se puede dispersar en agua la forma en polvo obtenida al concentrar el extracto líquido a presión reducida y/o secar el extracto líquido utilizando un método convencional.

El alcohol C₁-C₄ saturado con agua (segundo disolvente de extracción) puede ser butanol saturado con agua.

30 La presente invención incluye, dentro de su ámbito, una composición que comprende un compuesto aislado del extracto, es decir, una saponina esterooidal una sapogenina esterooidal. Es decir, la presente invención incluye una composición farmacéutica para tratar neuropatía periférica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto representado por la Fórmula 1 o una sal del mismo; y un vehículo farmacéuticamente aceptable:

[Fórmula 1]



45 en la que R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de C₁-C₄ o un sacárido.

En el compuesto de Fórmula 1, R puede ser hidrógeno o metilo, preferentemente hidrógeno. Es decir, el compuesto de Fórmula 1 puede ser 3-β, 25R-espirost-5-en-3-ol.

El sacárido puede ser monosacárido, disacárido o polisacárido como por ejemplo glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, celulosa, glicógeno, sacarosa, maltosa, y lactosa.

La sal del compuesto de Fórmula 1 puede ser una sal de adición de ácido orgánico y/o ácido inorgánico convencional, preparada a partir de compuestos de saponina o sapogenina esteroideal. Entre los ejemplos de la sal del compuesto de Fórmula 1 se incluyen las sales desveladas en la publicación de patente abierta internacional No. WO2003/082893. Estas sales se pueden preparar *in situ* durante los procesos de separación final y purificación del compuesto. En particular, se puede preparar una sal de adición de ácido haciendo reaccionar un compuesto refinado en una forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y separando después la sal producida (véase S. M. Berge, y col., *Pharmaceutical Salts*, J. Pharm. Sci., 66: p.1-19(1977)). La publicación de patente abierta internacional No. WO2003/082893 y la publicación de M. Berge, y col. se utilizan como referencia en la presente invención. Se puede preparar una sal de adición de base haciendo reaccionar un compuesto refinado en forma ácida con una base orgánica o inorgánica adecuada y separando la sal producida. La sal de adición de base puede ser un metal farmacéuticamente aceptable o una sal de amina. La sal de adición de ácido puede ser una sal preparada a partir de un ácido seleccionado entre ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácido nítrico. La sal de adición de base puede ser una sal preparada a partir de una base seleccionada entre hidróxido sódico, hidróxido potásico e hidróxido de amonio.

El compuesto de Fórmula 1 se puede aislar desde el extracto de acuerdo con una realización de la presente invención, sintetizar aplicando un procedimiento conocido (véase Herbert O. House, *Modern Synthetic Reactions*, The Benjamin Cummings Publishing Company, 1972), u obtener en el mercado (Sigma Co., USA.).

El procedimiento para aislar el compuesto de Fórmula 1 desde el extracto puede incluir un procedimiento de hidrólisis ácida y un procedimiento de recristalización utilizando el extracto obtenido de acuerdo con una realización de la presente invención (por ejemplo, un extracto obtenido utilizando el primer disolvente de extracción y el segundo disolvente de extracción.) Por ejemplo, el procedimiento para aislar el compuesto de Fórmula 1 desde el extracto puede incluir: la hidrolización con un ácido, como por ejemplo ácido clorhídrico 2,5 N, a una temperatura de 50 a 150 °C, preferentemente a aproximadamente 94°C, durante 30 minutos a 3 días, preferentemente durante aproximadamente 4 horas; la extracción en disolvente del hidrolizado obtenido (es decir, aglicona sapogenina) con un disolvente orgánico, como cloroformo, acetona, benceno o xileno, durante 1 a 60 minutos, preferentemente durante aproximadamente 15 minutos, y a continuación, la separación de la capa orgánica; cuando sea necesario, la concentración de la capa orgánica separada a una temperatura de 10 a 100°C, preferentemente de 30 a 35°C; la recristalización de la capa orgánica o la solución concentrada de la capa orgánica con alcohol de C₁-C₄ o solución alcohólica de C₁-C₄ (por ejemplo, solución en etanol al 95 %); y el lavado del precipitado obtenido con agua, cuando sea necesario, y la recristalización con acetona.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar neuropatía periférica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto de la familia *Dioscoreaceae* o un compuesto de Fórmula 1 o una sal del mismo; o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable, y se puede formular en una forma de dosis oral, una forma de dosis externa, supositorio y solución para inyección estéril, como por ejemplo polvos, granulado, comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones, siropes o aerosoles. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato cálcico, silicato de calcio, celulosa, metil celulosa, celulosa microcristalina, polivinil pirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio o aceite mineral. La composición farmacéutica puede incluir además un diluyente o un excipiente, como por ejemplo una carga, un expansor, un aglutinante, un agente de humectación, un disgregante o un tensioactivo. Una formulación oral sólida puede ser un comprimido, píldora, polvo, granulado o cápsula. Dichas formulaciones sólidas pueden incluir al menos un excipiente seleccionado por ejemplo entre almidón, carbonato cálcico, sacarosa, lactosa y gelatina. Por otra parte, dichas formulaciones sólidas pueden incluir además un lubricante como estearato de magnesio o talco. Una formulación oral líquida puede ser una suspensión, una solución, una emulsión o un jarabe. Asimismo, la formulación oral líquida puede incluir un diluyente, como agua, parafina líquida; humectantes; agentes edulcorantes; aromatizantes o conservantes. Una formulación parenteral puede ser una solución acuosa estéril, una solución no acuosa, una suspensión, una emulsión, una formulación liofilizada o un supositorio. Los disolventes no acuosos o agentes de suspensión pueden ser propilen glicol, polietilén glicol, aceite natural, como por ejemplo aceite de oliva o ésteres inyectables, como etilolato. Los vehículos para supositorios pueden ser witepsol, macrogol, Tween 61, mantequilla de cacao, Laurin o gelatina glicerinada.

En la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, la dosis del extracto de la familia *Dioscoreaceae* o el compuesto de Fórmula 1 puede variar dependiendo del estado del paciente o su peso corporal, la gravedad de la enfermedad, las formas de dosificación, las rutas de administración y el período de administración, pudiéndola determinar apropiadamente la persona especializada en la técnica. Por ejemplo, el extracto de la familia *Dioscoreaceae* o el compuesto de Fórmula 1 se pueden administrar en una cantidad de 0,0001 a 1000 mg/kg, preferentemente de 0,001 a 1000 mg/kg, al día. La administración puede completarse de una vez o en varias veces a lo largo del día. En la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, la cantidad del extracto de la familia *Dioscoreaceae* o el compuesto de Fórmula 1 puede estar comprendida dentro del intervalo de 0,001 a 50

% en peso por cada 100 % en peso de la composición farmacéutica.

La composición farmacéutica se puede administrar a mamíferos, como ratas, ratones, animales de ganado o seres humanos, a través de varias rutas, p.ej. vía oral, rectal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, inyección en la duramadre intrauterina o a través de inyección intracerebroventricular.

- 5 La presente invención incluye dentro de su ámbito una composición alimentaria para tratar neuropatía periférica que comprende un extracto de la familia *Dioscoreaceae* o el compuesto de Fórmula 1 como principio activo.

La composición alimentaria de acuerdo con la presente invención se puede utilizar como alimento funcional saludable. De conformidad con el Artículo 6727 de la Ley sobre Alimentos funcionales saludables de Corea, "alimento funcional saludable" se refiere a un alimento producido y tratado utilizando una fuente o componente que beneficia las funciones del organismo humano. "Funcional" se refiere a un consumo que tiene por objeto obtener un efecto beneficioso para la salud, es decir, el control de nutrientes con respecto a la estructura y función del organismo humano o una función fisiológica.

10

La composición de alimento de acuerdo con la presente invención puede incluir un aditivo alimentario convencional. La conformidad de dicho "aditivo alimentario" se determina, dado que no existe ninguna otra regulación, teniendo en consideración las normas y criterios del artículo correspondiente con arreglo a las normas generales del código de aditivos alimentario y pruebas generales aprobadas por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Corea.

15

Los artículos enumerados en el "código de aditivos de alimentos" incluyen sustancias químicamente sintetizadas, como cetona, glicina, citrato potásico, ácido nicotínico o ácido cinámico; aditivos naturales, como colorante de caqui, extracto de regaliz, celulosa cristalina, colorante de kaoliang o goma guar; o una formulación mixta, como formulación de glutamato L-sódico, aditivos alcalinos para tallarines, conservantes, formulaciones de colorantes de alquitrán.

20

La composición alimentaria de acuerdo con la presente invención puede incluir el extracto de la familia *Dioscoreaceae* o el compuesto de Fórmula 1 en una cantidad de 0,01 a 95 % en peso, preferentemente de 1 a 80 % en peso, por cada 100 % en peso de la composición alimentaria, para prevenir y/o tratar neuropatía periférica. Asimismo, para prevenir y/o tratar neuropatía periférica, la composición alimentaria se puede producir y tratar para obtener comprimidos, cápsulas, polvo, granulado, fase líquida o píldoras.

25

Por ejemplo, para producir un alimento funcional saludable en forma de comprimido, se puede granular una mezcla del extracto de la familia *Dioscoreaceae* o el compuesto de Fórmula 1, un excipiente, un aglutinante, un disgregante y otros aditivos aplicando un procedimiento convencional y, a continuación, llevar a cabo un procedimiento de moldeo por compresión con un lubricante. Alternativamente, se puede someter la mezcla directamente al procedimiento de moldeo por compresión. Asimismo, cuando sea necesario, el alimento saludable formulado en forma de comprimido puede incluir agentes edulcorantes y, cuando sea necesario, se puede revestir el alimento saludable formulado en forma de comprimido con materiales de revestimiento.

30

Entre los alimentos funcionales saludables en forma de cápsula, se puede producir una formulación de cápsula dura rellenando una cápsula dura convencional con una mezcla del extracto de la familia *Dioscoreaceae* o el compuesto de Fórmula 1 y un aditivo, como por ejemplo un excipiente o un granulado de la mezcla o gránulos revestidos de la mezcla; y se puede producir una formulación de cápsula blanda relleno un soporte de cápsula de gelatina con una mezcla del extracto de la familia *Dioscoreaceae* o el compuesto de Fórmula 1 y un aditivo, como por ejemplo un excipiente. Cuando sea necesario, la formulación de cápsula blanda puede incluir un plastificante, como glicerina o sorbitol, un agente conservante y un conservante.

35

40

El alimento funcional saludable en forma de píldora se puede producir por moldeo de una mezcla del extracto de la familia *Dioscoreaceae* o el compuesto de Fórmula 1, un excipiente, un aglutinante y un disgregante aplicando un procedimiento adecuado. Cuando sea necesario, se puede revestir el alimento funcional saludable en forma de píldora con azúcar blanca o con otros materiales de revestimiento o se puede cubrir con almidón, talco u otros materiales.

45

Un alimento funcional saludable en forma de granulado se puede producir granulando una mezcla del extracto de la familia *Dioscoreaceae* o el compuesto de Fórmula 1, un excipiente, un aglutinante y un disgregante aplicando un procedimiento adecuado. Cuando sea necesario, el alimento funcional saludable en forma de granulado puede incluir un agente aromatizante y un agente edulcorante.

- 50 El excipiente, el aglutinante, el disgregante, el lubricante, el agente edulcorante y el agente aromatizante utilizados en la presente invención se pueden en correspondencia con los materiales que presentan las mismas funciones o funciones similares desvelados en los documentos de referencia conocidos en la técnica (revisión de farmacopea coreana, Moonsungsa Publication Co., Korea Pharmaceutical University Association, Quinta edición, p33-48, 1989).

Modo de realización de la invención

La presente invención quedará descrita con mayor detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Dichos ejemplos tienen un fin únicamente ilustrativo no pretendiéndose limitar con ellos el ámbito de la presente invención.

Ejemplo 1: Preparación de extracto

5 Se secó *Dioscorea Nipponica* y se cortó su raíz en pequeñas secciones. Se añadieron a 500 g de la muestra 10 litros de solución de metanol al 85 % y se extrajo tres veces (cada una de ellas durante 2 horas) a temperatura ambiente. Se repitió este procedimiento de extracción dos veces. Se recogieron los sobrenadantes resultantes y se concentraron a presión reducida, para obtener así 74 g de un extracto bruto.

10 Se suspendieron los 74 g del extracto bruto en 1 litro de agua destilada, se añadió 1 litro de butano saturado con agua y a continuación, se separó la capa orgánica generada; se repitió esta operación cinco veces. Se recogieron las capas orgánicas obtenidas y se secaron a presión reducida. Como resultado, se obtuvieron 17 g del extracto de *Dioscorea Nipponica*

Ejemplo 2: Preparación de extracto

15 Se secó *Dioscorea quinqueoloba* y se cortó su raíz en pequeñas secciones. Se añadieron a 500 g de la muestra 5 litros de solución de etanol al 85 % y se extrajo tres veces (cada una de ellas durante 2 horas) a temperatura ambiente. Se repitió dos veces dicho procedimiento de extracción. Se recogieron los sobrenadantes resultantes y se concentraron a presión reducida, obteniendo así 90 g de un extracto bruto.

20 Se suspendieron los 90 g del extracto bruto en 1 litro de agua destilada, se añadió 1 litro de butanol saturado con agua y a continuación, se separó la capa orgánica generada; se repitió la operación cinco veces. Se recogieron las capas orgánicas obtenidas y se secaron a presión reducida. Como resultado, se obtuvieron 26 g del extracto de *Dioscorea quinqueoloba*.

Ejemplo 3: Preparación de extracto

25 Se secó *Dioscorea tokoro* y se cortó su raíz en pequeñas secciones. Se añadieron a 300 g de la muestra 3 litros de solución de etanol al 85 % y se extrajo tres veces (cada una de ellas durante 2 horas) a temperatura ambiente. Se repitió dos veces este procedimiento de extracción. Se recogieron los sobrenadantes resultantes y se concentraron a presión reducida, obteniendo así 35 g de un extracto bruto.

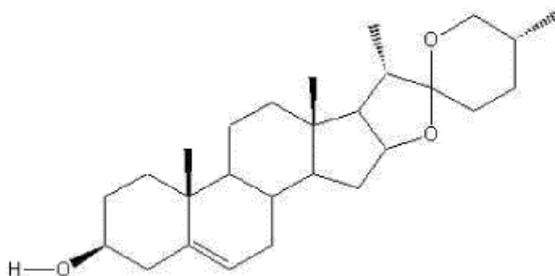
30 Se suspendieron los 35 g del extracto bruto en 0,5 litros de agua destilada, se añadieron 0,5 litros de butanol saturado con agua y a continuación, se separó la capa orgánica generada; se repitió la operación cinco veces. Se recogieron las capas orgánicas obtenidas y se secaron a presión reducida. Como resultado, se obtuvieron 11 g del extracto de *Dioscorea tokoro*.

Ejemplo 4: Separación del ingrediente activo

35 Se hidrolizó 1 g del extracto de *Dioscorea nipponica* obtenido en el Ejemplo 1 a 94 °C durante cuatro horas añadiendo 10 ml de 2,5N HCl a 10 ml del mismo. A continuación, se extrajo el hidrolizado resultante con 10 ml de cloroformo durante 15 minutos. Se separó la capa de cloroformo, se filtró y después se concentró a presión reducida a una temperatura de 30-35 °C. Se recristalizó el residuo obtenido a 4 °C utilizando 5 ml de solución de etanol al 95 %. Se filtró el precipitado recristalizado, se lavó con agua, se recristalizó a 4 °C utilizando 3 ml de acetona y a continuación, se filtró para obtener aproximadamente 100 mg del precipitado. Se identificó el precipitado 3beta, 25R-epirost-5-en-3-ol representado por la Fórmula 2.

[Fórmula 2]

40

(1) Fórmula: C₂₇H₄₂O₃

- (2) Peso molecular: 414,62
 (3) Punto de fusión: 204-207 °C
 (4) $[\alpha]^{25}_D$ -129°
 (5) Datos RMN: consultar Tabla 1

5

Tabla 1

¹³ C	Desplazamiento químico (δ)a	¹ H	Desplazamiento químico (δ)a
C-1	37,6-37,7	H-1	1,60-1,70;0,87-0,91 (m.o)
C-2	30,3-30,4	H-2	2,00-2,03;1,75-1,79 (m.o)
C-3	78,1-78,7	H-3	3,81-3,90 (m, J=4,7-5,6 Hz)
C-4	38,9-39,5	H-4	2,57-2,29 (m, J=13-14 Hz; J=5,0; 12,0 Hz)
C-5	140,9-141,1		
C-6	121,9-122,0	H-6	5,23-5,26 (d, J=4,6-5,4 Hz)
C-7	32,4-32,5	H-7	1,77-1,82; 1,41-1,46 (m.o)
C-8	31,8-31,9	H-8	1,44-1,48 (m.o)
C-9	50,4-50,5	H-9	0,80-0,83 (m)
C-10	37,2-37,3		
C-11	~21,3	H-11	1,35-1,38 (m.o)
C-12	40,0-40,1	H-12	1,60-1,62 (m.o)
C-13	40,6-40,7		
C-14	56,8-56,8	H-14	1,01 (m.o)
C-15	32,4-32,5	H-15	1,95-1,98 (m, J=5,9-6,1 Hz); 1,31-1,35 (m.o)
C-16	81,3-81,3	H-16	4,45-4,48 (m, J=7,0-7,4 Hz)
C-17	63,0-63,1	H-17	1,72-1,75 (m.o)
C-18	16,5-16,6	H-18	0,73-0,76 (s)
C-19	19,6-19,6	H-19	0,80-1,00 (s)
C-20	42,1-42,2	H-20	1,88 (m)
C-21	15,2-15,2	H-21	1,05-1,07 (d, J=6,8-7,2 Hz)
C-22	109,4-109,5		
C-23	32,0-32,0	H-23	1,57-1,63 (m.o)
C-24	29,4-29,5	H-24	1,48-1,52 (m.o)
C-25	30,8-30,8	H-25	1,50 (m.o)
C-26	67,0-67,1	H-26	3,50-3,40 (m, J=10,5; 3,0; 10,5 Hz)
C-27	17,5-17,5	H-27	0,60-0,63 (d, J=4,7-5,8 Hz)

Ejemplo Experimental 1: Medición de la extensión de las neuritas

10 Se cultivaron en una incubadora en condiciones de 5% de CO₂ y una temperatura de 37 °C, células PC12 (feocromocitoma, Número ATCC: CRL-1721) en un medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero de caballo (10%, v/v), suero bovino fetal (5%, v/v), y 1% penicilina-estreptomicina.

15 Para averiguar el efecto del Compuesto de Fórmula 2 en la extensión de las neuritas, se añadieron los medios suplementados con suero de caballo al 2 %, suero bovino fetal al 1 % y penicilina-estreptomicina al 2 % a cada uno de los pocillos de una placa de 6 pocillos revestida con poli-d-lisina y a continuación, se inocularon 5 x 10⁴ células PC12 en cada uno de los pocillos. Al cabo de 24 horas, se trataron estas células con 10 µl/ml de etanol, 10 µg/ml del compuesto de Fórmula 2, y 50 ng/ml de factor de crecimiento nervioso (R&D System, Estados Unidos), respectivamente. A continuación, al cabo de 48 horas, se midió la longitud de las neuritas utilizando un microscopio de contraste de imagen invertida (CK-2, Olympus, Estados Unidos) (véase FIG. 1 y FIG. 2)

20 En lo que se refiere a las FIGS. 1 y 2, no se observó la extensión de neuritas en el grupo al que se le inyectó etanol (control), pero se provocó la extensión de neuritas tanto en el grupo tratado con el compuesto de fórmula 2 (GD) como en el grupo tratado con factor de crecimiento nervioso (FCN). En consecuencia, se observó que el compuesto de Fórmula 2 provocó una diferenciación de células PC12 al provocar la extensión de las neuritas.

Ejemplo Experimental 2: Medición del nivel de factor de crecimiento nervioso en suero de ratón

Se disolvió el compuesto de Fórmula en 0,2 ml de una solución de sulfóxido de dimetilo: etanol (3:1) y a continuación se administró por vía oral una vez a ratones ICR macho de 7 semanas de vida (n=7) en una cantidad de 10 mg/kg. Al cabo de 24 horas, se midió la cantidad de factor de crecimiento nervioso endógeno por ELISA. Como grupo de control, se administró por vía oral a un ratón ICR una vez, 0,2 ml de sulfóxido de dimetilo: etanol (3:1). A continuación, se midió la cantidad del factor de crecimiento nervioso en el grupo control tal como se ha descrito antes.

En lo que se refiere a la FIG. 3, el grupo al que se le administró el compuesto de fórmula 2 (GD 10 mg/kg P.O.) presentó factor de crecimiento nervioso en el suero en una cantidad aproximadamente 2,5 veces mayor que el grupo de control. Dichos resultados demuestran que el compuesto de Fórmula 2 puede tratar la neuropatía suprimiendo la degeneración y muerte de neuronas en el ratón y evitando así el descenso del número de neuronas.

Ejemplo Experimental 3: Medición del nivel de factor de crecimiento nervioso en suero en ratones en los que se ha inducido diabetes

Se preparó un ratón con diabetes inducida con aloxana como modelo animal con neuropatía diabética, una de las neuropatías múltiples.

Se mantuvo en ayunas ratones ICR macho de 7 semanas de vida durante 18 horas y a continuación, se les inyectó una vez aloxana disuelto en solución salina fisiológica por inyección intraperitoneal en una cantidad de 160 mg/kg para inducir la diabetes. Se seleccionaron los ratones que mantuvieron la glucemia en ayunas en 200 mg/dl o más durante una semana, es decir, los ratones en los que se había inducido la diabetes y se dividieron en el grupo de control (n = 10), el grupo al que se le administró el extracto (n = 10) y el grupo al que se le administró el compuesto (n = 10). Se administró al grupo de control 0,2 ml de una solución de sulfóxido de dimetilo: etanol (3:1), se administró al grupo de administración de extracto, el extracto obtenido de acuerdo con el Ejemplo 1 disuelto en una solución de sulfóxido de dimetilo: etanol (3:1) en una cantidad de 100 mg/kg y al grupo de administración de compuesto el compuesto de Fórmula 2 disuelto en una solución de sulfóxido de dimetilo: etanol (3:1) en una cantidad de 10 mg/kg. Se administró a los tres grupos por vía oral, tres veces a la semana, y el periodo de administración total fue un mes. La cantidad de factor de crecimiento nervioso endógeno en suero fue medida por ELISA.

En lo que se refiere a la FIG. 4, las cantidades de factor de crecimiento nervioso endógeno en suero tanto del grupo al que se administró extracto (DN 100 mg/kg p.o) como del grupo al que se administró compuesto (GD 10 mg/kg p.o) fueron respectivamente tres y cuatro veces mayores que las del grupo de control al que se le inyectó únicamente vehículo. Dichos resultados demuestran que el extracto y el compuesto de acuerdo con la presente invención pueden tratar la neuropatía diabética suprimiendo la degeneración y muerte de neuronas en enfermedades asociadas con un daño del nervio causadas por diabetes y evitando así el descenso del número de neuronas.

Ejemplo Experimental 4: Medición de la velocidad de transmisión de nervio motor y nervio sensorial del nervio ciático en ratón en el que se ha inducido diabetes

Se identificó el efecto terapéutico del compuesto de acuerdo con la presente invención sobre la neuropatía diabética, una de las neuropatías múltiples, midiendo el efecto del compuesto de acuerdo con la presente invención sobre la velocidad de transmisión del nervio motor y el nervio sensorial del nervio ciático

Se mantuvo en ayunas ratones ICR macho de 7 semanas durante 18 horas y a continuación, se les inyectó una vez aloxana disuelta en solución salina fisiológica por inyección intraperitoneal en una cantidad de 160 mg/kg para inducir la diabetes. Se seleccionaron los ratones que mantuvieron la glucemia en ayunas en 200 mg/dl o más durante una semana, es decir, los ratones en los que se había inducido la diabetes y se dividieron en el grupo de control (n = 7), el grupo al que se le administró el compuesto (n = 7). Se administró al grupo de control 0,2 ml de una solución de sulfóxido de dimetilo: etanol (3:1), y se administró al grupo de administración de compuesto el compuesto de Fórmula 2 disuelto en una solución de sulfóxido de dimetilo: etanol (3:1) en una cantidad de 10 mg/kg. Se agrupó a los ratones ICR macho de siete semanas de vida en los que no se había inducido la diabetes en un grupo normal (n = 7) y el grupo normal al que se administraron 0,2 ml de una solución de sulfóxido de dimetilo: etanol (3:1). Se administró a los tres grupos por vía oral, tres veces a la semana, y el periodo de administración total fue 2 meses. Una vez completada la administración se sacrificó a los ratones por dislocación cervical y a continuación, se extirparon rápidamente la piel y el músculo en la región femoral. A continuación, se separaron respectivamente los nervios ciáticos de izquierda y derecha en una longitud de 20 mm o más y se almacenaron en solución salina fisiológica al mismo tiempo que se ventilaba la solución salina fisiológica. Se colocaron los nervios ciáticos separados en una placa de medición redonda de 20 mm. A continuación, se conectaron un sensor y una sonda de estimulación a los neuroterminales correspondientes y se midió la conductividad eléctrica utilizando un osciloscopio de almacenamiento digital para evaluar la velocidad de transmisión nerviosa (véase FIGS. 5 y 6.)

En general, la mielina es una membrana de fosfolípido que rodea los axones con varias capas y que también se denomina vaina de mielina. De forma semejante al revestimiento plástico de un cable eléctrico, la mielina, a través de un material lípido blanco, evita que las señales eléctricas transmitidas por las neuronas se filtren o se dispersen. La mielina está espaciada regularmente entre los nodos de Ranvier (una porción que forma nodos de mielina) en los

que no se forma la mielina, y rodea los axones. La señal eléctrica se transmite en el espacio, los impulsos son transmitidos rápidamente a lo largo de las neuronas y la mielina aumenta la velocidad del impulso eléctrico. Por consiguiente, cuando se destruye la mielina por daño del nervio como consecuencia de la neuropatía inducida por diabetes, los axones dejan de funcionar y desciende la velocidad de transmisión nerviosa.

- 5 Durante un período de un mes de diabetes inducida, el grupo al que se administró compuesto (DM-GD) presentó una velocidad de transmisión del nervio sensorial un 25 % mayor que la del grupo de control al que se indujo diabetes (DM) al que solamente se le administró vehículo (véase FIG. 5). Durante el período de dos meses de diabetes inducida, el grupo al que se administró el compuesto (DM-GD) presentó una velocidad de transmisión del nervio sensorial un 45 % mayor que el grupo de control y presentó una velocidad de transmisión del nervio motor un 40 % más alta que el grupo de control (véase FIG. 6). Por consiguiente, se observó que el compuesto de acuerdo con la presente invención tiene un efecto terapéutico sobre el daño del nervio como consecuencia de neuropatía al aumentar la velocidad de transmisión del nervio sensorial y el nervio motor de un ratón en el que se indujo diabetes.

Ejemplo Experimental 5: Medición del nivel de factor de crecimiento nervioso en nervio ciático en ratón en el que se ha inducido diabetes

- 15 Se mantuvo en ayunas ratones ICR macho de 7 semanas de vida durante 18 horas y a continuación, se les inyectó una vez aloxana disuelto en solución salina fisiológica por inyección intraperitoneal en una cantidad de 160 mg/kg para inducir la diabetes. Se seleccionaron los ratones que mantuvieron la glucemia en ayunas en 200 mg/dl o más durante una semana, es decir, los ratones en los que se había inducido la diabetes y se dividieron en el grupo de control (n = 5), y el grupo al que se le administró el compuesto (n = 5). Se administró al grupo de control 0,2 ml de una solución de sulfóxido de dimetilo: etanol (3:1), se administró al grupo de administración de compuesto el compuesto de Fórmula 2 disuelto en una solución de sulfóxido de dimetilo: etanol (3:1) en una cantidad de 10 mg/kg. Se administró a los tres grupos por vía oral, tres veces a la semana, y el periodo de administración total fue un mes. La cantidad de factor de crecimiento nervioso en el nervio ciático fue medida por ELISA (véase FIG. 7)

- 25 En lo que se refiere a la FIG. 7, se observó que el factor de crecimiento nervioso en el nervio ciático del grupo al que se le administró compuesto (DM-GD 10 mg/kg P.O.) fue aproximadamente 30% mayor que la del grupo de control al que se le inyectó únicamente vehículo. Por consiguiente, se considera que los resultados mostrados en la FIGS. 5 y 6 confirman la protección de la función del nervio del factor de crecimiento nervioso.

Ejemplo Experimental 6: Medición del cambio en la cantidad de sorbitol en nervio ciático de ratón en el que se ha inducido diabetes

- 30 Se identificó el efecto terapéutico del compuesto de acuerdo con la presente invención en la neuropatía midiendo el cambio en la cantidad de sorbitol en el nervio ciático.

- 35 Se mantuvo en ayunas ratones ICR macho de 7 semanas de vida durante 18 horas y a continuación, se les inyectó una vez aloxana disuelto en solución salina fisiológica por inyección intraperitoneal en una cantidad de 160 mg/kg para inducir la diabetes. Se seleccionaron los ratones que mantuvieron la glucemia en ayunas en 200 mg/dl o más durante una semana, es decir, los ratones en los que se había inducido la diabetes y se dividieron en el grupo de control (n = 3), y el grupo al que se le administró el compuesto (n = 3). Se administró al grupo de control 0,2 ml de una solución de sulfóxido de dimetilo: etanol (3:1), y se administró al grupo de administración de compuesto el compuesto de Fórmula 2 disuelto en una solución de sulfóxido de dimetilo: etanol (3:1) en una cantidad de 10 mg/kg. Los ratones ICR macho de 7 semanas de vida en los que no se indujo diabetes fueron agrupados como el grupo normal (n = 3) y el grupo normal al que se le administraron 0,2 ml de solución de sulfóxido de dimetilo: etanol (3:1). Se administró al grupo normal, al grupo de control y al grupo al que se le administró el compuesto, por vía oral, tres veces a la semana y durante un período de administración de 2 semanas. Una vez completada la administración se sacrificó a los ratones por dislocación cervical y después se midió la cantidad de sorbitol en el nervio ciático por HPC (véase FIG. 8).

- 45 La vía del poliol se refiere a un proceso en el que se convierte la glucosa en sorbitol mediante aldosa reductasa y el sorbitol cambia a fructosa mediante sorbitol deshidrogenasa. En un estado hiperglucémico, como la diabetes, el exceso de glucosa entra en las células y se genera y se acumula sorbitol a través de la vía del poliol. Llegado el caso, se pueden dañar los nervios por un fenómeno osmótico en el que entra agua en las células. Por tanto, tal como muestran los resultados de la medición del efecto del compuesto según la presente invención en la acumulación de sorbitol en el nervio ciático del ratón en el que se ha inducido diabetes, y tal como se muestra en la FIG. 8, se observó que el sorbitol en el nervio ciático del grupo de control en el que se había inducido diabetes (DM-CON) fue aproximadamente 40% más alta que en el grupo normal, pero el sorbitol en el nervio ciático del grupo al que se administró el compuesto (DMGD) fue 10% más baja que el del grupo de control en el que se había inducido diabetes (DM-CON). Dichos resultados demuestran que el compuesto según la presente invención puede disminuir parcialmente factores agresivos que causan daños en el nervio.

55

Ejemplo Experimental 7: Comparación histológica del nervio ciático de ratón en el que se ha inducido diabetes

Se identificó el efecto terapéutico del compuesto según la presente invención sobre neuropatía midiendo los cambios histológicos del nervio ciático.

5 Se mantuvo en ayunas ratones ICR macho de 7 semanas de vida durante 18 horas y a continuación, se les inyectó una vez aloxana disuelto en solución salina fisiológica por inyección intraperitoneal en una cantidad de 160 mg/kg para inducir la diabetes. Se seleccionaron los ratones que mantuvieron la glucemia en ayunas en 200 mg/dl o más durante una semana, es decir, los ratones en los que se había inducido la diabetes y se dividieron en el grupo de control (n = 5), el grupo al que se le administró el extracto (n = 5) y el grupo al que se le administró el compuesto (n = 3). Se administró al grupo de control 0,2 ml de una solución de sulfóxido de dimetilo: etanol (3:1), se administró al grupo de administración de extracto, el extracto obtenido de acuerdo con el Ejemplo 1 disuelto en una solución de sulfóxido de dimetilo: etanol (3:1) en una cantidad de 100 mg/kg y al grupo de administración de compuesto el compuesto de Fórmula 2 disuelto en una solución de sulfóxido de dimetilo: etanol (3:1) en una cantidad de 10 mg/kg. Se trató a los tres grupos con la administración por vía oral tres veces a la semana, y el periodo de administración total fue dos meses. Una vez completada la administración, se sacrificó a los ratones por dislocación cervical y a continuación, se separó el nervio ciático, se secó en las siguientes condiciones y después se observó con un microscopio confocal de 600x, 1200x.

(1) pre-fijación: 2,5% glutaraldehído, 12 o más horas
 (2) lavado: pH 7,4, 0.1 M solución de tampón fosfato, 15 minutos/dos veces
 (3) post-fijación: 1% OsO₄ tetróxido de osmio, 60 minutos
 (4) lavado: pH 7,4, 0,1 M solución de tampón fosfato, 5 minutos/dos veces
 (5) deshidratación:

50, 70, 80, 90 % alcohol: 10 minutos/cada uno
 100 % alcohol: 15 minutos/dos veces

(6) sustitución: óxido de propileno, 15 minutos/dos veces
 (7) permeación: óxido de propileno (1), EPOK 812 (2), 12 o más horas
 (8) embebido: EPOK 812 refinado (80 °C polimerización): 12 o más horas
 (9) seccionado: sección semi-delgada, 35-95 μm
 (10) teñido: 1% azul de toluidina

30 Las FIG. 9A y 9B presentan los resultados obtenidos con un aumento de 600 (9A) y un aumento de 12000 (9B), respectivamente. En el grupo en el que se indujo la diabetes (DM), el axón y la mielina de la parte central del nervio ciático quedaron significativamente destruidos. Sin embargo, en el grupo al que se le administró el compuesto (DM-DG) y el grupo al que se administró extracto (DM-DN), se observaron claramente el axón y la mielina en la parte central del nervio ciático. Estos resultados demuestran que el extracto o el compuesto de acuerdo con la presente invención pueden proteger y tratar los nervios dañados por la neuropatía.

Se formuló el compuesto de acuerdo con la presente invención tal como se muestra a continuación. Sin embargo estos ejemplos de formulación tienen un fin únicamente ilustrativo y no se pretende limitar con ellos el ámbito de la presente invención.

40	Ejemplo de Formulación 1:	Formulación de comprimido
	Compuesto de Fórmula 2	200 mg
	Lactosa	100 mg
	Almidón	100 mg
	Estearato de magnesio	cantidad adecuada

45 Se mezclaron estos componentes y se comprimieron en comprimidos de acuerdo con un procedimiento de formulación de comprimidos convencional.

50	Ejemplo de Formulación 2:	Formulación líquida
	Compuesto de Fórmula 2	1000 mg
	CMC-Na	20 g
	Azúcar isomerizada	20 g
	Aroma de limón	cantidad adecuada

Se añadió agua purificada para que el volumen de toda la solución fuera 1000 ml. Se mezclaron estos componentes según un procedimiento de formulación de líquidos convencional, se cargó en un frasco marrón y se esterilizó produciendo así la formulación líquida.

Ejemplo de Formulación 3: Formulación de cápsula

5	Compuesto de Fórmula 2	300 mg
	Celulosa cristalina	3 mg
	Lactosa	14,8 mg
	Estearato de magnesio	0,2 mg

Se mezclaron estos componentes con arreglo a un procedimiento de formulación de cápsulas convencional y se cargaron en una cápsula de gelatina para producir así una formulación de cápsula.

Ejemplo de Formulación 4: Formulación de inyección

10	Compuesto de Fórmula 2	300 mg
	Manitol	180 mg
	Agua destilada estéril inyectable	2974 mg
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	26 mg

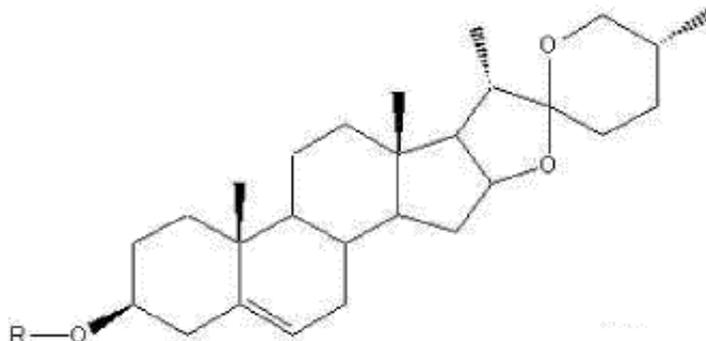
De acuerdo con un procedimiento de fabricación de inyección convencional, se fabricó una inyección que contenía los componentes en las cantidades indicadas por cada ampolla (2 ml).

15

REIVINDICACIONES

1. Un extracto de la familia *Dioscoreaceae* para su uso en el tratamiento de la neuropatía periférica, siendo la familia *Dioscoreaceae* al menos una especie seleccionada del grupo que consiste en *Dioscorea nipponica*, *Dioscorea septemloba*, *Dioscorea quinqueoloba*, *Dioscorea batatas*, *Dioscorea japonica*, *Dioscorea bulbifera*, *Dioscorea tokoro* y *Dioscorea tenuipes*, en el que el extracto se obtiene llevando a cabo un procedimiento de extracción que comprende la extracción de una raíz de una especie de la familia *Dioscoreaceae* con un primer disolvente de extracción seleccionado del grupo que consiste en agua, alcohol de C₁-C₄, y una mezcla de agua y un alcohol de C₁-C₄, y en el que el extracto contiene el compuesto de Fórmula 1

[Fórmula 1]



- en la que R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de C₁-C₄ o un sacárido.
2. El extracto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la especie de la familia *Dioscoreaceae* es *Dioscorea nipponica*, *Dioscorea quinqueoloba* o *Dioscorea tokoro*.
3. El extracto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la neuropatía periférica es la neuropatía múltiple.
4. El extracto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer disolvente de extracción es una mezcla de agua y metanol o una mezcla de agua y etanol.
5. El extracto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento de extracción comprende además la dispersión del extracto obtenido por extracción con el primer disolvente de extracción en agua, y la extracción con un segundo disolvente de alcohol C₁-C₄ saturado con agua.
6. El extracto para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el segundo disolvente de extracción es butanol saturado con agua.
7. El extracto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R es un átomo de hidrógeno.
8. El extracto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el sacárido se selecciona del grupo que consiste en glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, celulosa, glicógeno, sacarosa, maltosa y lactosa.
9. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la neuropatía periférica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del extracto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Un producto alimentario funcional saludable, para su uso en el tratamiento de la neuropatía periférica que comprende un extracto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

FIG. 1

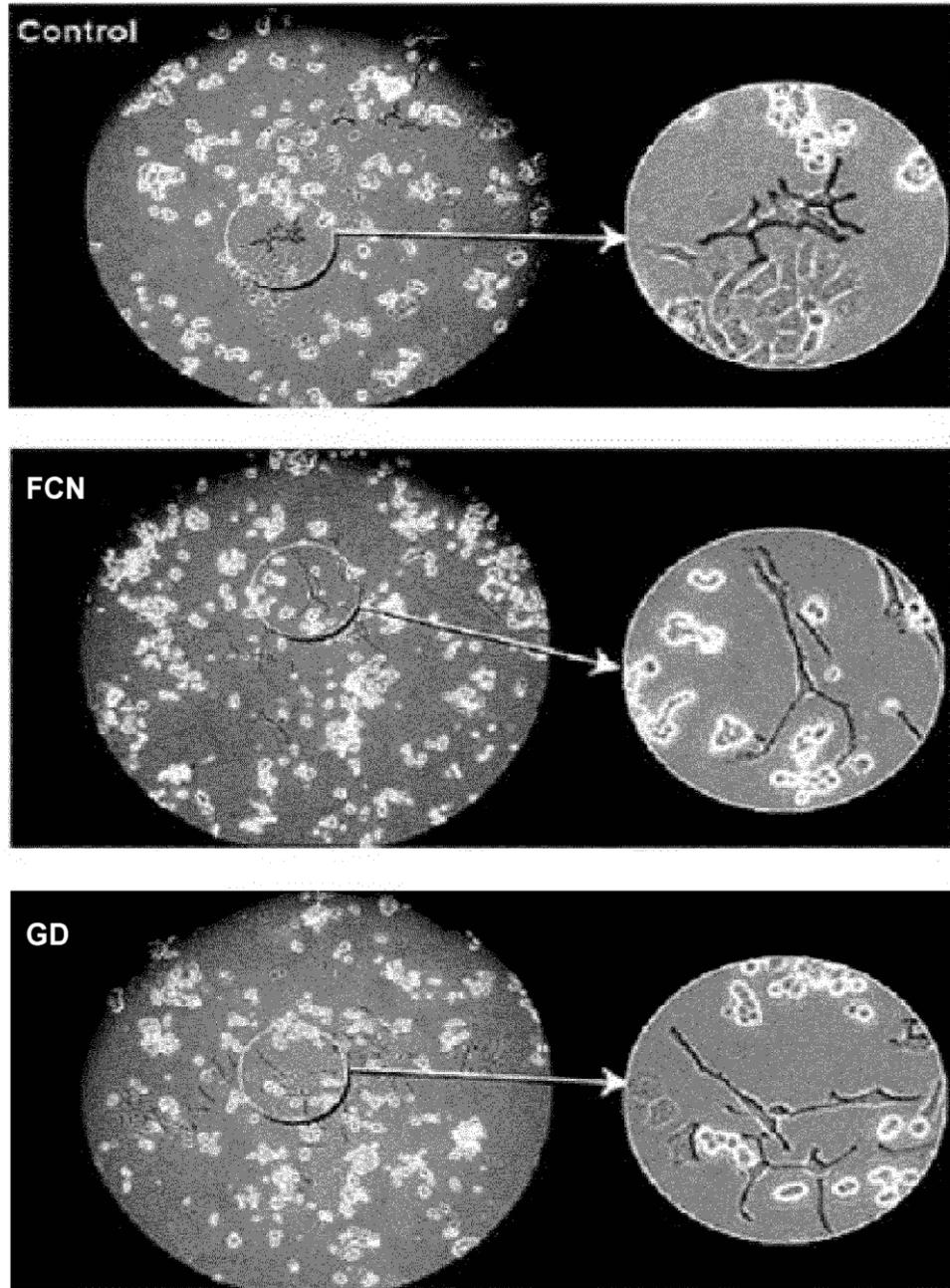


FIG. 2

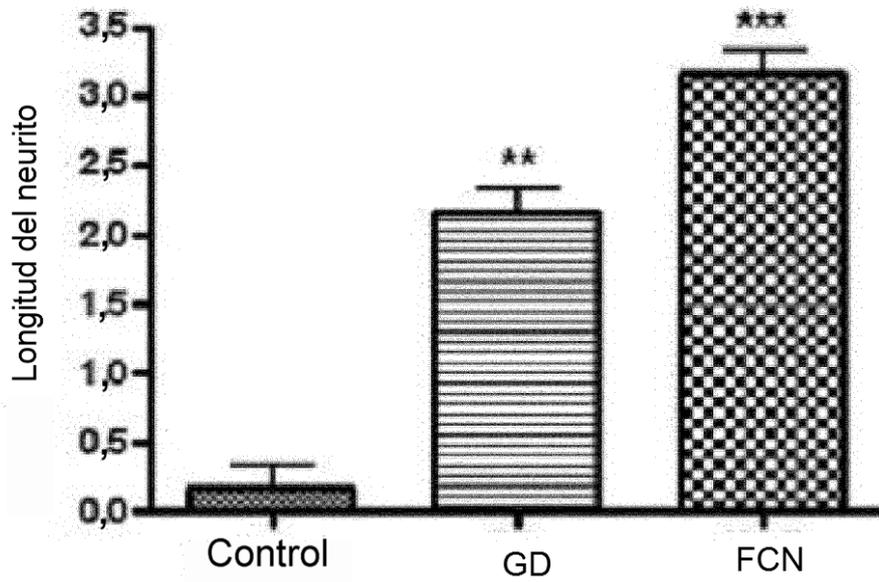


FIG. 3

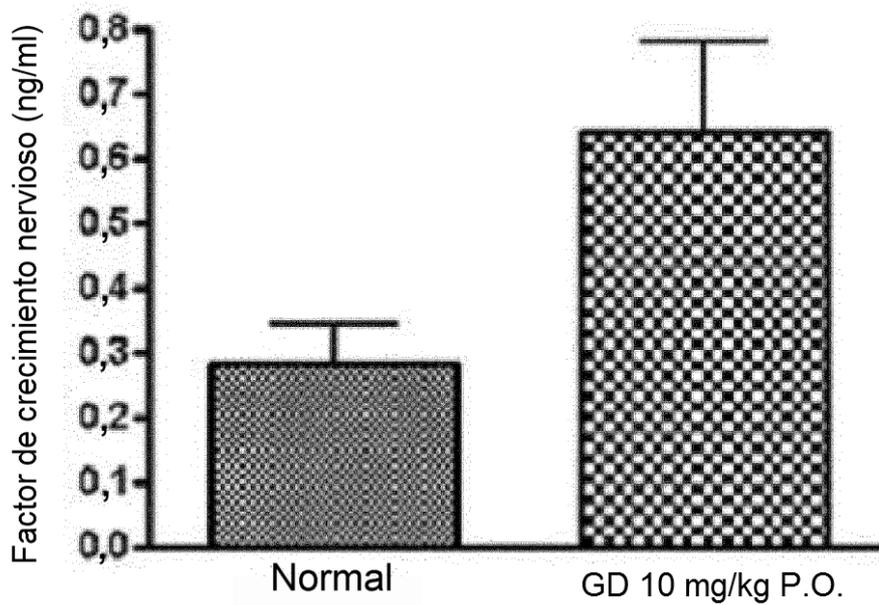


FIG. 4

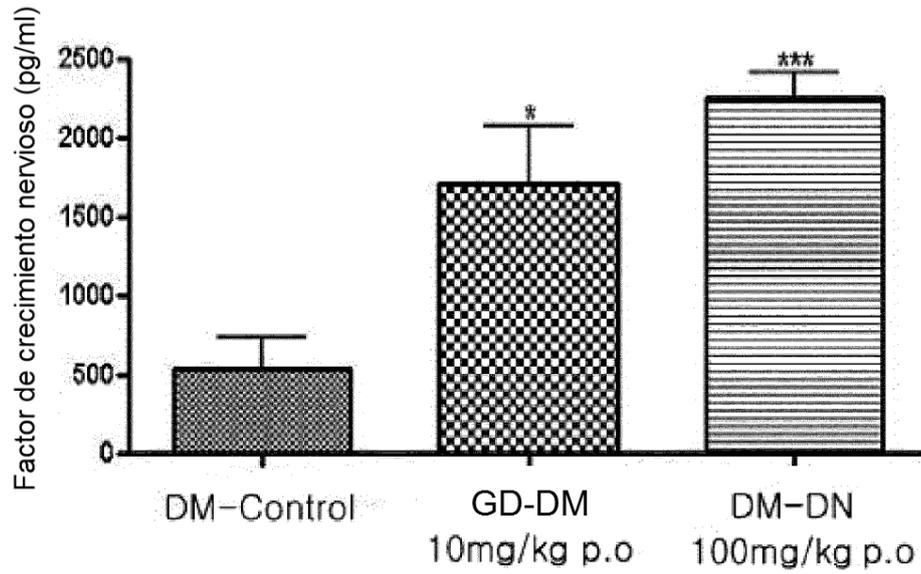


FIG. 5

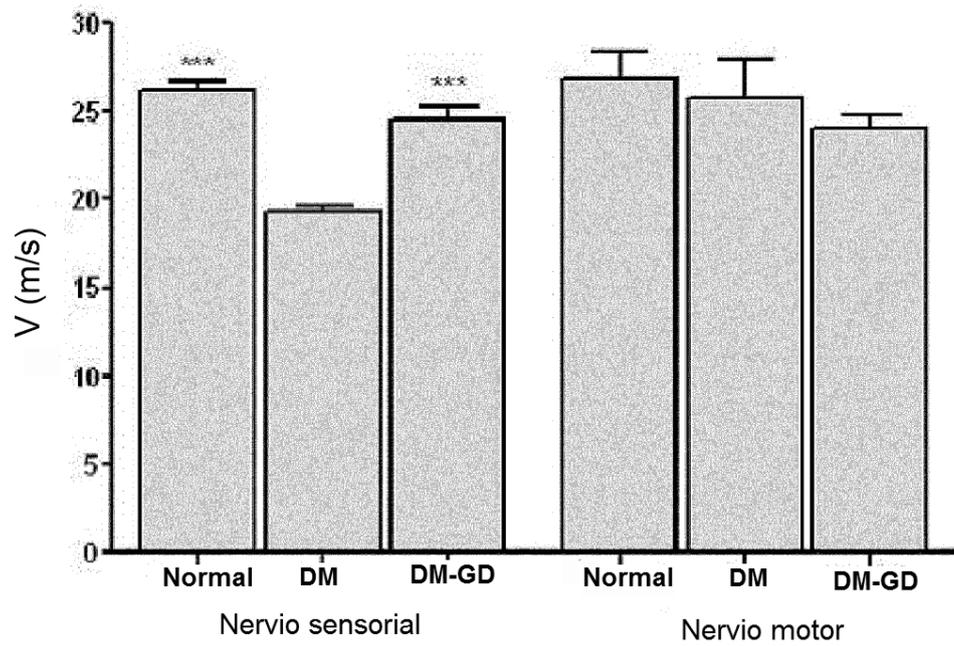


FIG. 6

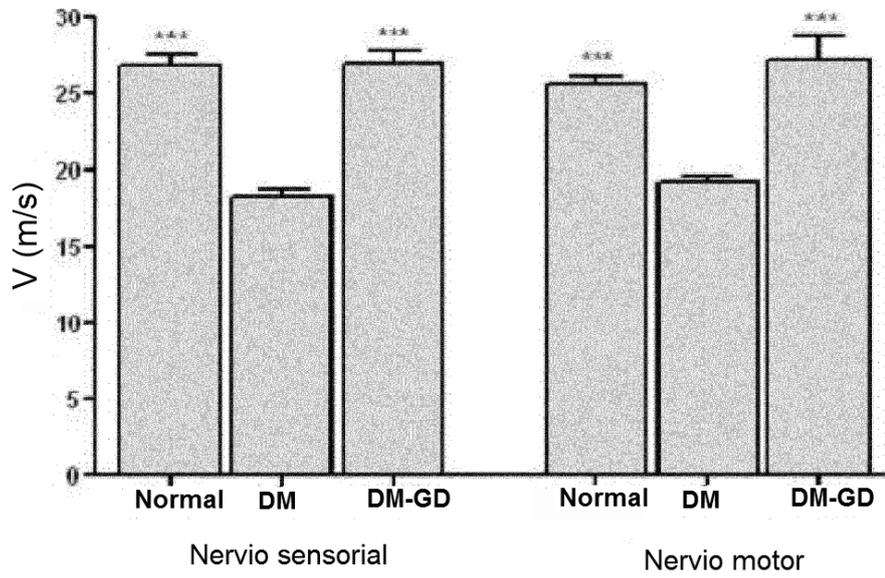


FIG. 7

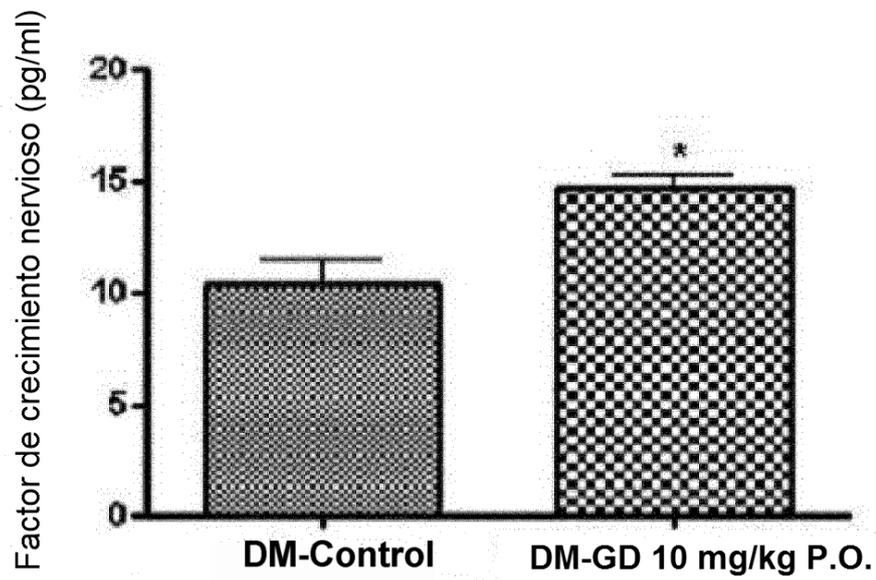


FIG. 8

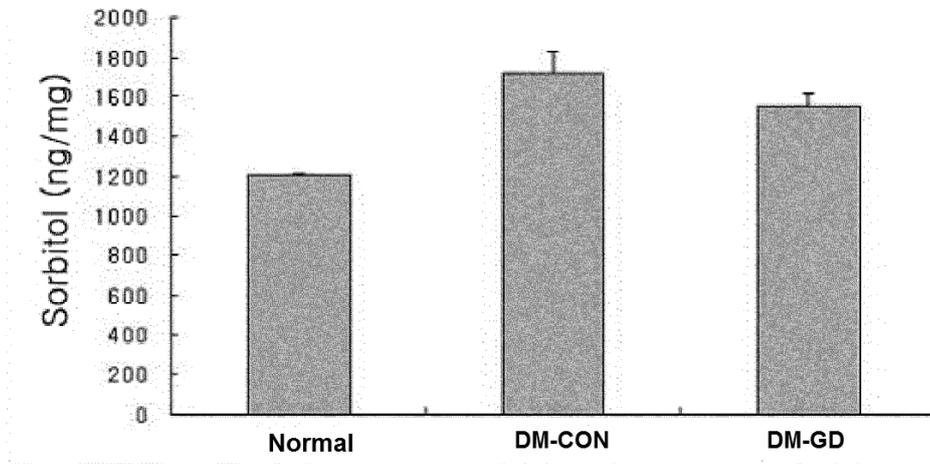


FIG. 9

