

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 374**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/12** (2006.01)

**A61K 31/205** (2006.01)

**A61K 31/385** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2015 PCT/IB2015/056266**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016 WO16027224**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2015 E 15771253 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3182965**

54 Título: **Composición para el tratamiento de neuropatías y/o dolor neuropático**

30 Prioridad:

**19.08.2014 IT TO20140670**

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

**18.12.2019**

73 Titular/es:

**KOLINPHARMA S.P.A. (100.0%)  
Via Larga 8  
20122 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**BIJNO, DOMENICO;  
DI VINCENZO, CARMINE;  
LUSENTI, EMANUELE;  
MARTINA, ALBERTO y  
PETRELLI, RITAPAOLA**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

ES 2 735 374 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 para el tratamiento de neuropatías y/o dolor neuropático

5 La invención se refiere a una composición que va a usarse en el campo del tratamiento de neuropatías y dolor neuropático.

10 En particular, la invención se refiere a una mezcla de compuestos capaz de ejercer tanto una acción neuroprotectora, mediada por una actividad antiinflamatoria y antioxidante, como una acción neurotrófica y energizante que puede suministrar nutrientes a las fibras y, aumentando el metabolismo energético, restaurar las membranas dañadas y por tanto la conducción nerviosa normal.

15 La invención se refiere a una formulación para administración oral, sin contraindicaciones particulares tanto con respecto a los sujetos a quienes se les va a administrar como con respecto a la cantidad administrada, que tiene un efecto antiinflamatorio, antioxidante y neurotrófico y por tanto es eficaz en el tratamiento de neuropatías y dolor neuropático.

20 La neuropatía es una patología que afecta al sistema nervioso periférico con la excepción del nervio craneal I y II, es decir el nervio olfativo y el nervio óptico, respectivamente. La neuropatía puede estar localizada en un nervio (mononeuropatía) o en varios nervios (polineuropatía).

Hay diversos tipos de degeneración que afectan a la fibra nerviosa:

25 (i) Degeneración walleriana como resultado de la interrupción del axón o del nervio con mantenimiento de tejido conjuntivo: tras aproximadamente 48 horas hay inflamación del axón con destrucción de mielina y fagocitosis de formaciones lipídicas globulares; después de algunos días, se observa gemación, atribuible al intento de regeneración con recuperación de aproximadamente 1 mm al día.

30 (ii) Degeneración axonal como resultado de cambios metabólicos: afecta a las partes distales de fibra inicialmente con progresión lenta en la dirección proximal.

35 (iii) Desmielinización segmentaria mediante daño primario a las células de Schwann mediante cambios metabólicos, procesos inflamatorios, daño tóxico: hay una ralentización gradual del impulso, que llega hasta el bloqueo cuando la desmielinización afecta a una longitud de fibra de más de 3 internódulos, hay tensión axonal y un intento de remielinización por parte de nuevas células en proliferación, pero la sucesión de procesos de desmielinización y remielinización provoca engrosamiento de la fibra mediante interposición de fibroblastos y colágeno, con formación de fibras con "bulbo de cebolla" palpable en la piel (polineuropatías desmielinizantes inflamatorias de Dejerine-Sottas hipertróficas, amiloidóticas y crónicas).

40 Basándose en la etiología, las neuropatías pueden clasificarse de la siguiente manera:

- neuropatías inflamatorias desmielinizantes (por ejemplo síndrome de Guillain-Barre);
- 45 - neuropatías debidas a agentes infecciosos (por ejemplo VIH, Epstein-Barr, lepra, sarcoidosis);
- neuropatías metabólicas (diabetes, porfirias, hipotiroidismo);
- neuropatías tóxicas nutricionales (alcohol, hipovitaminosis, drogas, metales tóxicos);
- 50 - neuropatías paraneoplásicas;
- neuropatías paraproteinémicas (amiloidóticas, gammapatías, crioglobulinemias);
- neuropatías en el transcurso de enfermedades del tejido conjuntivo;
- 55 - neuropatías hereditarias (por ejemplo síndrome de Charcot-Marie-Tooth).

60 Por tanto, las neuropatías periféricas son un grupo heterogéneo de enfermedades de los nervios periféricos. Hay múltiples causas y, tal como se mencionó anteriormente, están representadas por factores hereditarios y metabólicos, estrés oxidativo en el tejido nervioso, traumatismo, infecciones e inflamaciones. La mayor parte de las neuropatías periféricas se caracterizan por síntomas tales como dolor, debilidad muscular y pérdida sensorial, que se manifiestan en una discapacidad motora general del paciente.

65 El dolor neuropático es patológico en cuanto a que no representa una función útil y protectora para el organismo; de hecho, se caracteriza por un proceso de amplificación de los mensajes nociceptivos que puede manifestarse en el sistema nervioso tanto periférico como central.

A diferencia del dolor somático, que surge de terminaciones nerviosas particulares (los sensores de dolor ubicados en la dermis) y se percibe a través de daño tisular, el dolor neuropático surge directamente de una disfunción de los nervios y no implica que esté produciéndose un daño.

El dolor neuropático constituye un síntoma común en las neuropatías periféricas dependiendo de la longitud del nervio, y con frecuencia representa su síntoma inicial. Por tanto, las neuropatías periféricas pueden definirse como un proceso patológico que afecta principalmente a las fibras de mielina de diámetro pequeño o a las fibras no mielinizadas.

El dolor neuropático está asociado con numerosos tipos de signos y síntomas sensoriales que pueden manifestarse solos o junto con otras manifestaciones específicas en pacientes con dolor neuropático.

Entre los diversos mecanismos etiopatogénicos planteados como hipótesis y demostrados basándose en los signos y síntomas de las neuropatías mecánicas periféricas, puede mencionarse la alteración de los canales de sodio (neuropatías diabéticas), hiperexcitabilidad de las neuronas, cambios repentinos en la conexión espinal, fuerte estrés oxidativo sobre el tejido nervioso. Los mediadores de procesos inflamatorios también parecen tener un papel específico en la aparición de neuropatías degenerativas e inflamatorias.

En resumen, las causas de la sintomatología dolorosa de las extremidades superiores e inferiores son numerosas y de origen diverso, y pueden ser de interés ortopédico (mialgias, neuropatías por compresión o traumatismo). De hecho, un alto porcentaje de estos síndromes dolorosos de las articulaciones deben atribuirse a radiculopatías por irritación o compresión, con relevancia cervical en el caso de las extremidades superiores, y lumbosacra con respecto a las extremidades inferiores, cuya causa más común es una hernia discal. WANG YUNLIANG *ET AL.*, NEUROSCIENCE LETTERS, vol. 557, 2013, páginas 112-117 enseña que el tratamiento previo de neuronas corticales con el éster acetílico de L-carnitina y ácido  $\alpha$ -lipoico desempeña un papel protector sobre células neuronales corticales frente a la neurotoxicidad y el estrés oxidativo mediado por 4-hidroxi-2-nonenal.

La composición según la presente invención, eficaz en el tratamiento de neuropatías y dolor neuropático, se caracteriza porque comprende, como principios activos, una combinación de curcumina, N-acetil-L-carnitina y ácido alfa-lipoico. Características adicionales de la composición de la invención y de su uso se definen en las reivindicaciones adjuntas que forman una parte integrante de la presente descripción.

La curcumina, nombre IUPAC (1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona, es un compuesto que pertenece a la clase de compuestos polifenólicos. Se obtiene mediante extracción con disolvente a partir del rizoma seco y en polvo de la planta *Curcuma longa*. *Curcuma longa* es una planta que tiene su origen en el sudeste asiático y se usa tradicionalmente como especia. Esta planta se conoce desde la antigüedad por sus altas propiedades antioxidantes y se usa tradicionalmente para el tratamiento de la inflamación, trastornos gastrointestinales, trastornos hepáticos y otros trastornos. Su capacidad para resistir la acción de radicales libres es mucho mayor que la de otros antioxidantes naturales conocidos. De hecho, cúrcuma es rica en principios activos, en particular curcuminoides y entre ellos más particularmente curcumina. Debido a su actividad antioxidante y antiinflamatoria, *Curcuma longa* se considera un bioprotector celular, que puede contribuir activamente a la restauración de las condiciones basales del entorno neuronal comprometido.

A diferencia de otros antioxidantes, los curcuminoides son capaces tanto de prevenir la formación de radicales libres como de potenciar la actividad de ácido alfa-lipoico, neutralizando los radicales ya presentes en los tejidos.

Con respecto a la actividad antiinflamatoria, hay numerosos estudios que confirman la acción de cúrcuma a diversos niveles, permitiendo que se considere como un inhibidor muy potente de la cascada inflamatoria: a nivel genético, inhibe la expresión de ciclooxigenasa 2, inhibe la actividad de lipoxigenasa 5 y la producción de prostaglandinas mediante ciclooxigenasas 1 y 2. También inhibe la activación de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ), las moléculas de adhesión, receptores de factor de crecimiento y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), actividades correlacionadas con la aparición tumoral.

En las formulaciones según la invención, el extracto de *Curcuma longa* constituye la fuente preferida de curcumina. Más preferiblemente, se usa un extracto de *Curcuma longa* que tiene un título de curcumina del 95%. Los extractos de *Curcuma longa* también comprenden algunos derivados de curcumina, generalmente conocidos como curcuminoides, entre los cuales puede mencionarse en particular desmetoxicurcumina y bisdesmetoxicurcumina.

El ácido alfa-lipoico (ALA) es una vitamina muy pequeña que se produce en la naturaleza en dos formas, la forma oxidada (disulfuro cíclico) y la forma reducida (ácido dihidrolipoico, con dos grupos sulfhidrilo en la posición 6 y 8). Las dos formas pueden interconvertirse rápidamente y, a nivel de tejido dañado, se comportan como neuroprotector y neurotrófico y, a nivel sistémico, como agente euglicémico (una actividad fundamental ya que la mayoría de los pacientes diabéticos se ven afectados por neuropatías).

La acción neuroprotectora resulta de la actividad antioxidante conocida, que es capaz de reducir el estrés oxidativo a

nivel del tejido nervioso dañado. La presencia de radicales libres provoca el deterioro de las membranas celulares y en particular de las células de Schwann, reduciendo la funcionalidad del nervio y el rendimiento de transmisión, así como activando de manera no fisiológica las rutas de transducción vinculadas a NF- $\kappa$ B, lo cual estimula la respuesta inmunitaria (induciendo inflamación), regula la proliferación celular y la cascada apoptótica, pero también participa en la aparición de cáncer y enfermedades autoinmunitarias. El ácido alfa-lipoico es particularmente eficaz en neutralizar radicales libres: de hecho, actúa como eliminador, pero también es capaz de restaurar otros potentes antioxidantes a nivel celular, tales como vitamina E, vitamina C, coenzima Q y glutatión reducido.

El ácido alfa-lipoico es además capaz de inhibir la quimiotaxis fagocítica a nivel de daño neuronal y esto representa una confirmación de que la composición según la invención, que comprende ácido alfa-lipoico, es capaz de provocar la reducción de la inflamación y la inhibición del daño. De hecho, en el caso de degeneración de fibras nerviosas, los macrófagos acuden rápidamente al sitio afectado y fagocitan la mielina circundante, amplificando el daño y reduciendo adicionalmente la capacidad conductora de las neuronas implicadas, así como amplificando la respuesta por parte de la cascada inflamatoria.

El ácido alfa-lipoico también ejerce una acción neurotrófica a dos niveles: aumentar el metabolismo energético e inducir la producción de NGF (factor de crecimiento nervioso). El metabolismo energético se sostiene por la presencia de ácido alfa-lipoico dado que, ya desde el punto de vista fisiológico, es un cofactor de dos complejos enzimáticos clave implicados en el ciclo de Krebs. El primer complejo es piruvato deshidrogenasa, que cataliza la descarboxilación oxidativa de piruvato para dar acetil-CoA, mientras que el segundo es  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, que cataliza la conversión de  $\alpha$ -cetoglutarato en succinil-CoA, también en este caso mediante descarboxilación oxidativa. Los dos complejos enzimáticos son similares y las reacciones de descarboxilación tienen lugar con producción de un enlace tioéster de alta energía con coenzima A, lo cual es posible gracias a la disponibilidad de los grupos sulfhidrilo de ALA. El ciclo de Krebs es un ciclo metabólico de importancia fundamental en todas las células; permite la formación de energía química (ATP) mediante degradación de hidratos de carbono, grasas y proteínas, pero también suministra muchos precursores para la producción de aminoácidos y otras moléculas fundamentales en la célula. A nivel del tejido nervioso, resulta fundamental suministrar energía, tanto para mantener las funciones basales de las células como para restaurar membranas dañadas por la inflamación y por el estrés oxidativo, y para la producción de neurotransmisores y vesículas que son fundamentales para la comunicación entre células, o para la conducción nerviosa, que está degradada en el caso de neuropatías.

Además de la potenciación del metabolismo energético, el ácido alfa-lipoico es capaz de mejorar la producción de NGF. NGF es una proteína señal implicada en el desarrollo y el mantenimiento del sistema nervioso. Este factor fomenta y dirige el crecimiento axonal y, por medio de mecanismos de señalización celulares, es un producto indispensable durante la regeneración, como factor de crecimiento.

Se conoce que la mayoría de los individuos con diabetes son propensos a complicaciones relacionadas con dolor neuropático. Esto representa otro motivo por el cual la composición según la invención incluye ácido alfa-lipoico, que tiene actividad euglicémica, es decir que es capaz de intervenir en el metabolismo de sacáridos, resensibilizando los receptores de insulina y restaurando la actividad fisiológica de la propia insulina, ayudando al tratamiento farmacológico.

El tercer componente de la composición según la invención es N-acetil-L-carnitina, es decir el éster acetílico de L-carnitina, un compuesto presente fisiológicamente en todos los mamíferos. El compuesto se metaboliza en la sangre para dar carnitina, gracias a esterasas en plasma. La función principal de carnitina es el transporte de ácidos grasos de cadena larga desde el citoplasma hasta la matriz mitocondrial, como resultado de su activación para dar acil-CoA. Una vez en la matriz, se usan y se oxidan los ácidos grasos. La función de carnitina está relacionada con la regulación intracelular de una razón correcta entre acil-CoA y acil-carnitina, transfiriendo grupos acilo de cadena corta desde el interior de la mitocondria hasta el citoplasma. La disponibilidad de L-carnitina y sus ésteres tales como N-acetil-carnitina previene la acumulación de ácidos grasos y acil-CoA en el citoplasma y en la mitocondria respectivamente, y permite el establecimiento de acetil-CoA en el sitio mitocondrial para la producción de energía mediante el ciclo de beta-oxidación. El exceso de acetil-CoA provocará un aumento del número de hidratos de carbono que pueden usarse para propósitos de energía en perjuicio de los ácidos grasos. Por tanto, es interesante observar que en sujetos diabéticos la ingesta de N-acetil-carnitina puede mejorar el metabolismo de la glucosa.

La presencia de N-acetil-carnitina en la composición según la invención es particularmente ventajosa porque esta sustancia actúa sobre varios frentes de manera sinérgica con ácido alfa-lipoico. N-acetil-carnitina tiene actividad neurotrófica, pudiendo aumentar el nivel de producción de NGF e inducir un aumento de la sensibilidad de receptores neuronales frente al factor de crecimiento, amplificando sus respuestas. Este aspecto es importante para la inducción de la producción de la vaina de mielina necesaria para mantener la salud y funcionalidad del nervio, así como para restaurar sus condiciones fisiológicas en caso de daño.

Junto con ácido alfa-lipoico, con el que ejerce un efecto sinérgico, N-acetil-carnitina es capaz de potenciar la protección neuronal, regulando a nivel génico las rutas implicadas en el crecimiento celular (un aspecto fundamental para la inducción de gemación y para la sinaptogénesis), en la activación de proteínas antiapoptóticas (para contrarrestar la cascada apoptótica inducida por NF- $\kappa$ B en el caso de un fuerte estrés oxidativo y/o daño a nivel de

fibra nerviosa) y antioxidantes (para neutralizar el entorno que rodea a las neuronas dañadas y/o para prevenir el daño oxidativo).

5 La combinación de los principios activos anteriormente mencionados en la composición según la invención es particularmente ventajosa ya que desarrollan un efecto sinérgico, tanto con respecto a la acción neuroprotectora como con respecto a la acción neurotrófica.

10 Según un aspecto preferido de la presente invención, las composiciones en cuestión podrán contener componentes adicionales, con acción terapéutica, o acción complementaria, o útiles de otro modo para los propósitos propuestos de la invención. Ejemplos de dichos componentes adicionales son vitamina C, vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6 y vitamina B12.

15 La vitamina B1, o tiamina, es una vitamina soluble en agua que, una vez que alcanza los tejidos, se fosforila para dar difosfato de tiamina (o pirofosfato), su forma activa. El pirofosfato de tiamina (PP) es la coenzima de las descarboxilasas de cetoácidos y transcetolasas. De hecho, realiza un papel importante en la descarboxilación oxidativa de piruvato y de  $\alpha$ -cetoglutarato (sinergia con ALA) en el ciclo de Krebs y en la reacción de transcetolasa en el ciclo de fosfato de pentosa.

20 La vitamina B2, o riboflavina, es un compuesto heterocíclico obtenido a partir de una molécula de flavina que está unida a una cadena formada a partir de ribitol. La riboflavina, una vez metabolizada, se transforma en mononucleótido de flavina (FMN) y dinucleótido de flavina y adenina (FAD), dos formas de coenzima esenciales para las enzimas de flavina en las que funcionan como grupos prostéticos. Toman parte en diversas reacciones redox en el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos, incluyendo descarboxilación oxidativa de piruvato, oxidación de ácidos grasos y aminoácidos, y transporte de electrones durante la fosforilación oxidativa.

25 La vitamina B6, en las tres formas de piridoxina, piridoxal y piridoxamina, participa en los mecanismos de neuroprotección, así como fomenta la conversión de triptófano en serotonina, proporcionando reducción de los síntomas de dolor.

30 La vitamina B12, o cobalamina, participa en procesos de reparación de la vaina de mielina ya que participa en la síntesis de fosfolípidos, catecolaminas y fosfatidilcolina (elementos estructurales de membrana).

35 La vitamina E, o tocoferol, es una vitamina soluble en grasa considerada como la vitamina antioxidante por excelencia. En la composición según la invención, su propósito es aumentar la producción de lípidos a nivel de la membrana neuronal, las primeras dianas de los radicales libres.

40 La vitamina C, o ácido ascórbico, también es fundamental por sus propiedades antioxidantes conocidas. Esta función se ejerce cuando la vitamina C experimenta autooxidación y después regenera sustancias oxidadas tales como hierro o cobre, devolviéndolas a su forma original. Durante este proceso, se retira el agente oxidante dañino. Es capaz de bloquear especies reactivas de oxígeno (ROS, tales como radicales superóxido, peróxido e hidropéroxido), pero también nitrógeno (RNS, tal como los radicales nitróxido, peroxinitrito y dióxido de nitrógeno) que puede formarse en el sitio de la inflamación. La vitamina C es un elemento fundamental para el correcto funcionamiento del cerebro y el sistema nervioso, y de hecho en condiciones de estrés se consume más rápidamente. Las composiciones de la invención pueden formularse de cualquier forma adecuada para la administración oral, por ejemplo como cápsulas de gelatina duras o blandas, comprimidos, comprimidos efervescentes o masticables, gránulos o polvos en sobres, formas sólidas con liberación controlada, chicles y similares.

50 Las composiciones de la presente invención pueden formularse de una manera que sea adecuada para la administración por vía oral y se prepararán mediante métodos convencionales que se conocen bien en la tecnología farmacéutica, tales como los descritos en "Remington's Pharmaceutical Handbook", Mack Publishing Co., N.Y., EE.UU., usando excipientes, diluyentes, cargas y agentes antiaglomerantes que son aceptables para su uso final.

55 La siguiente sección experimental describe los estudios que se han llevado a cabo con respecto a los efectos biológicos de la composición de la invención. En la descripción de los estudios llevados a cabo, se hace referencia a las figuras adjuntas, en las que:

60 - la figura 1 es una representación de los resultados obtenidos con el ensayo de MTT en células THP-1 incubadas con Xinepa. Se midió la absorbancia a 450 nm en los diversos pocillos incubados durante 16 horas con los compuestos mencionados a las concentraciones mencionadas. Cada barra representa el valor medio de al menos 4 pocillos diferentes (\*\*= $p < 0,001$ );

65 - la figura 2 es una representación de los resultados obtenidos en el ensayo ELISA 1a para cuantificar TNFalfa en el medio de cultivo de monocitos THP-1 diferenciados como resultado de incubación previa con Xinepa y los diversos controles en ausencia de estímulo inflamatorio (A) o en presencia de estímulo inflamatorio, es decir incubación con LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  durante 2 horas (B) (\*\*= $p < 0,001$ );

- 5 - la figura 3 es una representación de los resultados obtenidos en el ensayo ELISA 1a para cuantificar IL-1beta en el medio de cultivo de monocitos THP-1 diferenciados como resultado de incubación previa con Xinepa y los diversos controles en ausencia de estímulo inflamatorio (A) o en presencia de estímulo inflamatorio, es decir incubación con LPS 1 µg/ml durante 2 horas (B) (\*\*=p<0,001);
- 10 - la figura 4 es una representación de los resultados obtenidos en el ensayo ELISA 1a para cuantificar IL-6 en el medio de cultivo de monocitos THP-1 diferenciados como resultado de incubación previa con Xinepa y los diversos controles en ausencia de estímulo inflamatorio (A) o en presencia de estímulo inflamatorio, es decir incubación con LPS 1 µg/ml durante 2 horas (B) (\*\*=p<0,001);
- 15 - la figura 5 es una representación de los resultados obtenidos en el ensayo 1b para cuantificar la translocación nuclear de NF-kB;
- 20 - la figura 6 es una representación de los resultados obtenidos en el ensayo 2 para cuantificar la actividad antioxidante de Xinepa; se incubaron los monocitos THP-1 durante aproximadamente 16 horas con los compuestos indicados en la figura y después se sometieron a un estímulo inflamatorio durante 2 horas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de manera concomitante con diferenciación en medio libre de suero (\*=p<0,05);
- 25 - la figura 7 es un gráfico que muestra la vitalidad celular expresada como porcentaje con respecto al control (células sin tratar) como resultado de tratamiento durante 24 horas de células THP-1 con los tres componentes del complemento alimenticio Xinepa. Componente A (azul) = cúrcuma; componente B (rojo) = ácido lipoico (concentraciones de referencia facilitadas en el eje de las X), vitamina C y acetato de vitamina E; componente C (verde) = N-acetil-L-carnitina (n = 2; repeticiones = 3);
- 30 - la figura 8 es un gráfico que muestra la vitalidad celular expresada como porcentaje con respecto al control (células sin tratar) como resultado de tratamiento durante 24 horas de células THP-1 con los tres componentes individuales (A - B - C) y como mezcla (A + B + C) del complemento alimenticio Xinepa. Componente A (azul) = cúrcuma; componente B (rojo) = ácido lipoico (concentraciones de referencia facilitadas en el eje de las X), vitamina C y acetato de vitamina E; componente C (verde) = N-acetil-L-carnitina. Componentes A + B + C (naranja) (n = 2; repeticiones = 3);
- 35 - la figura 9 muestra el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia media (MFI) expresada como porcentaje con respecto al control positivo emitida por las células THP-1 tras el tratamiento (24 horas) con los componentes individuales A, B y C o la mezcla A+B+C (al menos n = 2; repeticiones = 1). \*p≤0,05 \*\*p≤0,01: significación con respecto al control positivo (Ctrl+);
- 40 - la figura 10 es un gráfico que muestra la vitalidad celular expresada como porcentaje con respecto al control (células sin tratar) como resultado de tratamiento durante 24 horas de células THP-1 con los tres componentes del complemento alimenticio Xinepa. Componente A (azul) = cúrcuma; componente B (rojo) = ácido lipoico (concentraciones de referencia facilitadas en el eje de las X), vitamina C y acetato de vitamina E; componente C (verde) = N-acetil-L-carnitina (n = 2; repeticiones = 3);
- 45 - la figura 11 es un gráfico que muestra la vitalidad celular expresada como porcentaje con respecto al control (células sin tratar) como resultado de tratamiento durante 24 horas de células THP-1 con los tres componentes individuales (A - B - C) y como mezcla (A + B + C) del complemento alimenticio Xinepa. Componente A (azul) = cúrcuma; componente B (rojo) = ácido lipoico (concentraciones de referencia facilitadas en el eje de las X), vitamina C y acetato de vitamina E; componente C (verde) = N-acetil-L-carnitina. Componentes A + B + C (naranja) (n = 2; repeticiones = 3);
- 50 - la figura 12 es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento (24 h) de las células THP-1 con los componentes individuales A, B y C o la mezcla A+B+C sobre la producción de IL-1β, en presencia de LPS. Ctrl: células no tratadas y no estimuladas (n = 1; repeticiones = 2, placas leídas tres veces);
- 55 - la figura 13 es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento (24 horas) de las células THP-1 con los componentes individuales A, B y C o la mezcla A+B+C sobre la producción de IL-1β, en presencia de LPS. Valores expresados como porcentaje con respecto a células sin tratar (n = 1; repeticiones = 2, placas leídas tres veces). \*p≤0,05 \*\*p≤0,01: significación con respecto al control (prueba de Kruskal-Wallis);
- 60 - la figura 14 es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento (24 horas) de las células THP-1 con los componentes individuales A, B y C o la mezcla A+B+C sobre la producción de TNFα, en presencia de LPS. Ctrl: células no tratadas y no estimuladas (n = 1; repeticiones = 2, placas leídas tres veces);
- 65 - la figura 15 es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento (24 horas) de las células THP-1 con los componentes individuales A, B y C o la mezcla A+B+C sobre la producción de TNFα, en presencia de LPS. Valores

expresados como porcentaje con respecto a células sin tratar (n = 1; repeticiones = 2, placas leídas tres veces). \*p≤0,05 \*\*p≤0,01: significación con respecto al control (prueba de Kruskal-Wallis).

5 A continuación en el presente documento se presenta una formulación particularmente preferida de la composición de la invención, usada en los estudios experimentales.

EJEMPLO DE FORMULACIÓN – comprimido de 1,08 g

10 Tabla 1

N-acetil-carnitina	400 mg
Ácido alfa-lipoico	300 mg
Extracto seco de <i>Curcuma longa</i>	150 mg
del cual, cúrcuma	142,95 mg
Vitamina C	125 mg
Vitamina E	9 mg
Vitamina B1 (tiamina)	6,25 mg
Vitamina B2 (riboflavina)	6,25 mg
Vitamina B6 (piridoxina)	2,38 mg
Vitamina B12 (cianocobalamina)	6,25 mg

La dosis recomendada es de uno o dos comprimidos al día.

15 EJEMPLO 1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y CUANTIFICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO

#### Fundamento

20 La composición de la invención tiene, como diana patológica, el dolor neuropático procedente de traumatismo o procedente de un efecto inflamatorio. El dolor neuropático es un estado crónico provocado por lesiones o disfunciones del sistema nervioso somatosensitivo. El daño a un nervio periférico puede provocar una amplificación de la respuesta, como resultado de estímulos dolorosos aplicados de manera periférica, a nivel de la primera sinapsis de la ruta nociceptiva, provocando hiperactividad neuronal a nivel de la médula espinal. Las células no neuronales tienen un papel clave en los mecanismos moleculares del dolor neuropático. En particular, como resultado del daño de un nervio periférico, puede observarse alteración de la "barrera sangre-médula espinal" (BSCB), con la consiguiente infiltración de macrófagos y linfocitos T. Estas células del sistema inmunitario periférico, junto con astrocitos y células de la microglía, secretan citocinas proinflamatorias y quimiocinas provocando la sensibilización de las neuronas de la primera sinapsis de la ruta nociceptiva. La inhibición de las citocinas proinflamatorias y la inducción de expresión de citocinas antiinflamatorias pueden provocar la atenuación de la nocicepción.

#### Propósito del estudio

35 El presente estudio analizó dos de los aspectos implicados en la aparición y persistencia de dolor neuropático, la inflamación y el estrés oxidativo. Por tanto, se desarrollaron dos ensayos celulares diferentes:

Ensayo 1: Evaluación de la actividad antiinflamatoria en una línea celular de monocitos humanos (THP-1).

40 Ensayo 2: Cuantificación del estrés oxidativo en una línea celular de monocitos humanos (THP-1).

Antes de estos dos ensayos, se llevó a cabo el ensayo 0 para definir los tiempos de incubación y las concentraciones de producto que iban a usarse sin encontrar fenómenos de toxicidad celular.

#### 45 Materiales y métodos

##### Xinepa

50 En las pruebas experimentales presentadas a continuación, se usó la formulación como comprimidos del ejemplo de formulación facilitado anteriormente, denominado Xinepa.

55 Xinepa demostró ser insoluble en agua, etanol al 100%, metanol, acetato de etilo, DMSO, ya que algunos de sus componentes son solubles en agua pero no en alcoholes (tales como vitamina B2), o solubles en alcoholes o disolventes orgánicos pero no en agua (tales como ácido lipoico y cúrcuma). Por este motivo se solubilizaron los componentes individuales de Xinepa, cada uno en el disolvente apropiado, y después se mezclaron de nuevo para reproducir el producto Xinepa.

Se tomó la concentración de ácido lipoico (LA) de 500  $\mu$ M como referencia, conociéndose su efecto antiinflamatorio en células THP-1 (Zhang W-J *et al.*, PNAS, 2007, vol. 104, páginas 4077-4082). Basándose en la concentración de LA, se añadieron los demás componentes para formar el compuesto final, manteniendo las mismas cantidades relativas presentes en Xinepa, tal como se ilustra en el ejemplo de formulación. Con estas condiciones de preparación, la disolución final con la que se incubaron las células durante las pruebas era transparente.

Los controles positivos con los que se compararon los efectos determinados con Xinepa en las diversas pruebas llevadas a cabo son: dexibuprofeno y nimesulida para el efecto antiinflamatorio (ensayo 1), vitamina E y vitamina B6 para el efecto antioxidante (ensayo 2).

#### Células

Se cultivaron células THP-1 humanas derivadas de leucemia monocítica aguda (ATCC, n.º de cat. TIB-202) en medio RPMI-1640 (Life Technologies, n.º de cat. 21870-076) con adición de piruvato de Na 1 mM, HEPES 10 mM, L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 0,05 mM y suero bovino fetal a una concentración final del 10%. Se mantuvieron las células en una incubadora a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% y se sembraron cada 3-4 días a una densidad de aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/ml. Para todas las pruebas llevadas a cabo, se sembraron las células por la tarde en placas de 96 pocillos y se incubaron con diversas concentraciones de Xinepa, de su vehículo y del/de los control(es) positivo(s) en medio completo.

Tras la incubación durante aproximadamente 16 horas, se diferenciaron las células en medio libre de suero durante 2 horas en presencia o ausencia de lipopolisacárido (LPS) (1  $\mu$ g/ml).

#### Ensayo de MTT (ensayo 0)

Para verificar que la incubación con Xinepa a las concentraciones y durante los tiempos seleccionados no es tóxica para las células, se llevaron a cabo uno o más ensayos de MTT (ensayo 0). Este ensayo colorimétrico se basa en la transformación de sal de tetrazolio de MTT (amarillo) en formazán (violeta), mediante el sistema de reductasa succinato-tetrazolio, que pertenece a la cadena respiratoria de las mitocondrias y sólo es activo en células metabólicamente activas. En resumen, las células crecidas en una placa de 96 pocillos se incubaron con la disolución de MTT durante 4 horas. En este periodo, se forma un colorante insoluble, que tras haberse solubilizado añadiendo la disolución de solubilización (SDS al 10% en HCl 10 mM) a las muestras y tras la incubación durante la noche en la incubadora, puede cuantificarse leyendo la absorbancia de las muestras a 595 nm (usando 750 nm como la longitud de onda de referencia). La absorbancia medida se correlaciona directamente con el número de células vivas.

#### Ensayo ELISA (ensayo 1a)

Se estudió el efecto antiinflamatorio de Xinepa usando el ensayo ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, Biolegend, Inc.), cuantificando la producción de citocinas proinflamatorias en el medio de cultivo tras el tratamiento con Xinepa y con los diversos controles.

En ELISA de tipo "sándwich", se recubre una placa de 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal específico para una citocina particular. Se añaden los patrones y las muestras a los pocillos y la citocina de interés se une al anticuerpo de captura inmovilizado sobre el fondo del pocillo. A continuación se añade un anticuerpo anti-citocina biotinilado a los pocillos de modo que se forma el "sándwich" de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Después se añade peroxidasa del rábano conjugada a estreptavidina, seguido por una disolución de tetrametilbencidina (TMB) que, al reaccionar con el peróxido, produce un compuesto de color azul, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de citocina presente. La adición de una disolución de ácido sulfúrico cambia el color de la disolución de azul a amarillo, bloqueando el desarrollo del color y permitiendo una lectura precisa de la absorbancia de las muestras a 450 nm.

Después las células incubadas con los diversos tratamientos durante la noche se diferenciaron durante 2 horas en medio libre de suero y se estimularon de manera concomitante con LPS (lipopolisacárido, uno de los componentes de la membrana exterior de bacterias Gram-negativas). Al final del tratamiento se recogió el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta que se usó para el ensayo.

#### Translocación nuclear de NF-kB (ensayo 1b)

Tras la incubación durante la noche con los diversos tratamientos, se sembraron las células THP-1 sobre portaobjetos funcionalizados con poli-L-lisina al 0,01% en presencia de LPS 1  $\mu$ g/ml durante 2 horas. Tras las 2 horas, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% en PBS (15 min), se permeabilizaron con una disolución de Triton X-100 al 0,2% en PBS (10 min) y se bloquearon los sitios de unión no específica con el anticuerpo primario con disolución de BSA al 1% en PBS (30 min). En la misma disolución de bloqueo, se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo p65 anti-NF-kB (Biolegend Inc.) diluido 1:200 (2 horas a temperatura ambiente), seguido por incubación con el anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo Atto488, diluido 1:200 en la disolución de bloqueo. Se marcó el ADN con Hoechst33342 para identificar los núcleos y se montaron los portaobjetos con

Prolong Gold (Life Technologies).

Se adquirieron las muestras así preparadas en el microscopio confocal (TCS SP5 AOBS, Leica Microsystems) y se analizaron las imágenes con el software ImageJ v1.47h (<http://imagej.nih.gov/ij>) para cuantificar la translocación nuclear de NF-kB (Noursadeghi M. *et al.*, Journal of Immunological Method, 2008, vol. 329, páginas 194-200). Para cada muestra, se adquirieron al menos 10 imágenes, con referencia a la señal nuclear (Hoechst33342) y a la señal de NFkB (Atto488) con un objetivo de 20x (HC PL APO CS, NA 0,5, Leica Microsystems). Para cada campo, se crearon las imágenes binarias de las señales de NF-kB y de Hoechst33342, usando un umbral automático. Se usó la máscara relacionada con la señal de Hoechst33342 para definir las ROI nucleares (regiones de interés). Después se retiraron las máscaras nucleares a partir de la imagen binaria de NF-kB para definir la ROI citoplasmática. Después se aplicaron estas máscaras a las señales originales de NF-kB para calcular la intensidad de fluorescencia en el núcleo y en el citoplasma a partir de los histogramas de las intensidades creados con ImageJ. Después se calculó la razón promedio de la intensidad de fluorescencia entre el núcleo y el citoplasma para cada muestra.

15 Evaluación de los niveles intracelulares de ROS (ensayo 2)

El estrés oxidativo en células THP-1 previamente incubadas con Xinepa o con los diversos controles y estimuladas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM durante 2 horas durante el periodo de diferenciación en medio libre de suero se cuantificó por medio de una sonda fluorogénica, reactivo rojo oscuro CellROX® (Life Technologies) capaz de medir las especies reactivas de oxígeno (ROS) en células vivas. El principio de funcionamiento de la sonda se basa en el hecho de que no es fluorescente en el estado reducido, mientras que tras la oxidación desarrolla una señal fluorescente con un pico de excitación a 640 nm y un pico de emisión a 665 nm. En resumen, al final del periodo de estimulación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se incubaron las células con reactivo rojo oscuro CellROX® a una concentración final de 5 μM en el medio a 37°C durante 30 min. Se marcaron los núcleos con Hoechst33342 y se leyeron las fluorescencias de ambos canales (rojo oscuro CellROX® y DAPI) en el fluorómetro de placas GloMax (Promega Italy). Se normalizaron las señales de fluorescencia relacionadas con las ROS con respecto a la señal de Hoechst33342 para cancelar la variabilidad en la señal de fluorescencia leída debida al número de células presentes en cada pocillo.

Después también se adquirieron las mismas placas en el microscopio confocal con el propósito de obtener imágenes representativas relacionadas con cuantificaciones de los diversos tratamientos.

Análisis estadístico

Se expresaron los datos cuantitativos relacionados con los diversos ensayos como media ± error estándar. Se usó la prueba estadística ANOVA de un factor (comparación entre más de dos grupos) o la prueba de la t (comparación entre dos grupos) con datos sin acoplar para identificar diferencias estadísticamente significativas entre las diversas muestras.

Resultados

40 Identificación de dosis y tiempos de tratamiento (ensayo 0)

Se incubaron las células THP-1 durante la noche con diluciones sucesivas de Xinepa, comenzando a partir de la composición que tenía la concentración de ácido lipoico de 500 μM como referencia. Para excluir un posible efecto tóxico atribuible al protocolo de incubación seleccionado, se cuantificó la vitalidad celular mediante el ensayo de MTT. Los datos obtenidos en dos días de experimento diferentes se resumen en la figura 1.

Dado que la concentración más alta de Xinepa provocó una alta mortalidad celular, los siguientes ensayos se llevaron a cabo con Xinepa 50, 75 y 100 μM. A estas concentraciones del compuesto, la absorbancia medida no fue estadísticamente diferente del control (células incubadas con el vehículo de Xinepa con referencia a la concentración más alta). De manera similar, la incubación con los controles positivos nimesulida e ibuprofeno a una concentración de 100 μM (Mouithys-Mickalad A. *et al.*, BBRC, 2004, vol. 325, páginas 1122-30) no identificó ningún efecto de toxicidad sobre las células.

55 Actividad antiinflamatoria en una línea de monocitos humanos (ensayo 1)

Se estudió la actividad antiinflamatoria de Xinepa con dos enfoques experimentales diferentes: por un lado, se cuantificó la posible inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias mediante ensayo ELISA (ensayo 1a), y por otro lado se cuantificó la posible inhibición de la translocación nuclear de NFkB mediante inmunomarcaje en fluorescencia y adquisición de imágenes con el microscopio confocal (ensayo 1b).

Ensayo ELISA, ensayo 1a

Se evaluó la liberación de las citocinas proinflamatorias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en el medio de cultivo mediante los monocitos THP-1 diferenciados tanto en ausencia como en presencia de estimulación con LPS durante 2 horas. Los

datos obtenidos para  $TNF\alpha$  se resumen en la figura 2.

En ausencia de estímulo inflamatorio, la producción de  $TNF\alpha$  fue muy baja, pero, tal como se esperaba, se amplificó considerablemente mediante estimulación con LPS.

5 La incubación durante 16 horas con Xinepa 75  $\mu M$  y 100  $\mu M$  provocó una reducción estadísticamente significativa de la liberación de  $TNF\alpha$  con respecto a la condición de control (incubación con el vehículo de Xinepa, barra blanca). La liberación de  $TNF\alpha$  en el medio de cultivo como resultado de la incubación con Xinepa 100  $\mu M$  fue significativamente inferior con respecto al control positivo nimesulida, que mostró acción antiinflamatoria, tal como se esperaba. En cambio, la incubación con ibuprofeno no provocó ninguna reducción de la liberación de  $TNF\alpha$  con respecto al control.

15 Los datos relacionados con la cuantificación de  $IL-1\beta$  se resumen en la figura 3. Al igual que para  $TNF\alpha$ , la cuantificación de  $IL-1\beta$  también mostró un aumento significativo de la liberación como resultado del estímulo inflamatorio con LPS, aunque menor que el aumento medido para  $TNF\alpha$ . También en este caso, el efecto fue significativamente mejor con respecto al control a todas las concentraciones de Xinepa sometidas a prueba y comparable a o mejor que el medido para nimesulida, que sin embargo fue eficaz en reducir la liberación de  $IL-1\beta$ . En cambio, el ibuprofeno no tuvo ningún efecto sobre la liberación de  $IL-1\beta$ .

20 Los datos relacionados con la cuantificación de  $IL-6$  se resumen en la figura 4. La liberación de  $IL-6$  no se vio estimulada significativamente mediante la estimulación con LPS, y probablemente requería tiempos de incubación más prolongados.

25 Translocación nuclear de NF-kB (ensayo 1b)

La cuantificación de la translocación nuclear de NF-kB como resultado de estímulo inflamatorio con LPS, con o sin incubación previa con Xinepa, con nimesulida o con los controles negativos respectivos, no detectó un papel claramente antagonizante de Xinepa sobre la translocación de NF-kB al núcleo (figura 5).

30 Evaluación de los niveles intracelulares de ROS (ensayo 2)

35 La acción antioxidante de Xinepa se resume en la figura 6. La incubación durante la noche con Xinepa 50 ó 75  $\mu M$  condujo a una mayor resistencia de los monocitos THP-1 frente a la producción de ROS como resultado de la estimulación con  $H_2O_2$  100 mM durante 2 horas con respecto a la incubación con el vehículo solo. De los 2 controles positivos sometidos a prueba, sólo la vitamina E mostró una acción antioxidante parcial en el presente sistema, aunque los niveles de ROS promedio no fueron significativamente diferentes de su control (incubación con vehículo sólo).

40 Conclusiones

Xinepa demostró tanto propiedades antiinflamatorias como propiedades antioxidantes en el modelo celular de monocitos humanos THP-1 usado para este estudio.

45 EJEMPLO 2. ESTUDIO DE LA SINERGIA CONTRA RADICALES LIBRES ENTRE LOS COMPONENTES DE UN COMPLEMENTO ALIMENTICIO EN CULTIVOS CELULARES DE MONOCITOS HUMANOS (THP-1)

50 El propósito del ensayo es evaluar la actividad antioxidante de los componentes individuales del complemento alimenticio Xinepa y la sinergia entre los mismos, midiendo su capacidad para neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS) en una línea celular de monocitos humanos (THP-1). Para identificar las concentraciones no citotóxicas del producto en cuestión, se usó un ensayo colorimétrico (ensayo de MTT) como prueba preliminar.

La tabla 2 a continuación muestra la composición del producto usado en el ensayo en cuestión.

55 Tabla 2

Sustancia	mg/dosis (un comprimido)
Cúrcuma	150,00
Ácido lipoico	300,00
Vitamina C	125,00
Acetato de vitamina E	9,00
N-Acetil-L-carnitina	400,00
Vitamina B1	6,25
Vitamina B2	6,25
Vitamina B6	6,25

Vitamina B12	6,25
--------------	------

Los componentes individuales sometidos a prueba para investigar la sinergia se muestran a continuación:

- COMPONENTE A: cúrcuma
- COMPONENTE B: ácido lipoico, vitamina C, acetato de vitamina E
- COMPONENTE C: N-acetil-L-carnitina

Teniendo en cuenta que el complemento alimenticio entra en contacto con el tracto gastrointestinal, se supuso que a nivel del estómago el comprimido puede disolverse mediante la acción de los jugos gástricos en un volumen de aproximadamente 50 ml, produciendo unas concentraciones finales de los componentes iguales a las facilitadas en la tabla 3 a continuación.

El componente C no provocó problemas en la disolución en medio RPMI con adición del 10% de suero bovino fetal (FBS), L-glutamina 2 mM y antibióticos (penicilina 100 UI/ml y estreptomycinina 100 µg/ml) (medio completo). En cambio, cúrcuma y ácido lipoico, que tienen solubilidades muy bajas en disolución acuosa, se disolvieron previamente en dimetilsulfóxido (DMSO) y después se diluyeron en medio completo, de tal manera que el porcentaje de disolvente presente no era superior al 0,2%, una concentración que se sabe que no es citotóxica.

Tabla 3: Concentración de los componentes de Xinepa suponiendo una disolución completa en 50 ml

Componente	Sustancia	mg/dosis (un comprimido)	Concentración (mg/ml)*
A	Cúrcuma	150,00	3,00
B	Ácido lipoico	300,00	6,00
	Vitamina C	125,00	2,50
	Acetato de vitamina E	9,00	0,18
C	N-Acetil-L-carnitina	400,00	8,00

\*Valores relacionados con los componentes individuales suponiendo un volumen de 50 ml

#### Cultivos celulares

Se llevaron a cabo las pruebas en monocitos humanos THP-1 (número de ATCC: TIB-202TM).

Se cultivaron las células THP-1 en medio completo (indicado anteriormente) y en condiciones de esterilidad completa (a 37°C con atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5%).

#### Ensayo de citotoxicidad

El ensayo de MTT es un ensayo de citotoxicidad colorimétrico que hace posible someter a prueba la proliferación y vitalidad celulares basándose en la eficiencia de la respiración mitocondrial. MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio) es una sal de tetrazolio que se reduce por el entorno altamente reductor en las mitocondrias de células vivas mediante la acción de deshidrogenasa mitocondrial. La reducción de MTT provoca la formación de cristales de formazán que proporcionan la coloración púrpura característica a las mitocondrias de células vivas. En cambio, en células muertas o células alteradas, y por tanto con mitocondrias inactivas, MTT no se reducirá, con una consiguiente coloración púrpura menos intensa o ausente. Por tanto, aunque es una prueba que evalúa la respiración celular, se considera que el ensayo de MTT es un método excelente para determinar la vitalidad celular. Por este motivo se usó como análisis preliminar para determinar las concentraciones no citotóxicas de los componentes individuales del complemento alimenticio Xinepa y mezcla de los mismos con el propósito de encontrar aquellas útiles para el ensayo de ROS.

Como preparación para la prueba, se sembraron las células de manera uniforme en placas de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células por pocillo y se incubaron a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5%, y simultáneamente, se trataron las células siguiendo diluciones en serie (1:2) con el fin de identificar la máxima concentración no citotóxica para cada componente.

Se llevó a cabo el tratamiento durante 24 horas. Al final, tras un breve lavado en PBS, se añadieron 20 µl de MTT (disolución madre, 5 mg/ml) en PBS a las células THP-1 durante 2 horas a 37°C. Al final del tiempo de incubación, tras retirada del medio y lavado en PBS, se añadieron 100 µl de DMSO para la solubilización de los cristales de formazán. Se realizó una lectura espectrofotométrica con un lector de microplacas (Tecan Sunrise) a una longitud de onda de 570 nm. Se calculó la vitalidad celular midiendo la densidad óptica de las concentraciones sometidas a prueba con respecto al control (células sin tratar).

#### Ensayo de ROS

Se evaluó la actividad antioxidante de los componentes individuales y sinergia entre los mismos como eficiencia de neutralización de las ROS producidas por las células THP-1 tras la aplicación de un agente oxidante: peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a una concentración de 100 μM. Se midieron las ROS mediante el método descrito en Boulton S., Anderson A., Swalwell J., *et al.*, 2011 Implications of using the fluorescent probes, dihydrorhodamine 123 and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, for the detection of UV-A induced reactive oxygen species. *Free Radical Research*; 45: 115-122, que hace uso de la transformación de diacetato de dihidro-2'-7'-diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF-DA) en un derivado fluorescente en presencia de ROS. Específicamente, la sonda de H<sub>2</sub>DCF-DA penetra en las células en las que se diesterifica para dar una forma no fluorescente (H<sub>2</sub>DCF) mediante las esterasas endógenas. En presencia de las ROS intracelulares, H<sub>2</sub>DCF se oxida para dar un compuesto fluorescente, diclorofluoresceína (DCF). Después se cuantifica la DCF producida leyendo con un citómetro de flujo y es proporcional a la cantidad de ROS presente en la muestra que está examinándose.

Como preparación para el ensayo, se sembraron las células THP-1 de manera uniforme y se trataron con las concentraciones máximas que se encontró que no eran citotóxicas en el ensayo de MTT en placas Petri a una densidad de 3,5 x 10<sup>5</sup> células en 3 ml de medio completo y se incubaron a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5%.

Tras 18 horas desde la siembra, se retiró el medio completo y se sustituyó por medio libre de suero para una incubación adicional durante 2 horas en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM).

Después de esto, se lavaron las células con PBS y se incubaron con disolución de H<sub>2</sub>DCF-DA, previamente disuelta en etanol a una concentración de 1 mg/100 μl, durante 30 min (5 μM) en un termostato con CO<sub>2</sub> a 37°C.

Tras la retirada de la disolución de H<sub>2</sub>DCF-DA, se lavaron las células, se recogieron y se midió la fluorescencia de la DCF mediante análisis con un citofluorímetro de flujo Coulter Epics XL. Se analizaron al menos diez mil células para cada muestra y se cuantificó la intensidad de fluorescencia media mediante el software XL2 del instrumento.

#### Resultados

Los resultados obtenidos se facilitan en forma de tabla y gráfica que contiene las medidas de vitalidad celular (ensayo de MTT) y posible reducción de las ROS producida como resultado del tratamiento con los componentes individuales del producto Xinepa o mediante su sinergia. En este caso, el parámetro tomado en consideración es la MFI (intensidad de fluorescencia media), es decir la media geométrica de la intensidad de fluorescencia de DCF, que es proporcional a la cantidad de ROS.

Los valores mostrados representan la media ± DE de al menos dos experimentos llevados a cabo de manera individual. Para el análisis estadístico, a la vista del pequeño número de datos que van a analizarse, se seleccionó la prueba de Kruskal-Wallis, un método no paramétrico realizado con datos ordenados usando una hoja de datos de Excel generada por el Prof. J.H. McDonald (universidad de Delaware (<http://www.socscistatistics.com/Default.aspx>)).

#### Vitalidad celular

Se incubaron células THP-1 (tiempo de tratamiento de 24 horas) con diferentes concentraciones de los componentes individuales con el fin de identificar las concentraciones que no provocan mortalidad celular mayor del 30%. A partir de los resultados obtenidos, los componentes individuales mostraron un intervalo variable de citotoxicidad; la tabla 4 proporciona el intervalo sometido a prueba para cada componente (5 concentraciones con diluciones sucesivas de 1:2) dentro del cual es posible identificar la concentración máxima no citotóxica.

Tabla 4. Intervalo de concentración sometido a prueba para cada sustancia.

COMPONENTE	SUSTANCIA	INTERVALO SOMETIDO A PRUEBA (mg/ml)
A	Cúrcuma	0,03-0,0019
B	Ácido lipoico	0,75-0,0469
	Vitamina C	0,313-0,0196
	Acetato de vitamina E	0,0225-0,0014
C	N-Acetil-L-carnitina	4-0,25

La figura 7 muestra un gráfico relacionado con la vitalidad celular de los tres componentes, expresada como porcentaje con respecto al control (células sin tratar), en función de concentraciones crecientes de los componentes A, B y C.

La tabla 5 proporciona los datos expresados como porcentaje. Las vitalidades mínimas consideradas aceptables se muestran en rojo.

Tabla 5. Vitalidad celular expresada como porcentaje para cada componente.

Componente A

Cúrcuma (mg/ml)	0	0,0019	0,0038	0,0075	0,015	0,03
Vitalidad celular (%)	100	102,093	100,571	80,195	37,675	15,814

5

Componente B

Ácido lipoico (mg/ml)	0	0,0469	0,0938	0,1875	0,375	0,75
Vitamina C (mg/ml)	0	0,0196	0,0391	0,0783	0,1565	0,313
Acetato de vitamina E (mg/ml)	0	0,0014	0,0028	0,0056	0,0113	0,0225
Vitalidad celular (%)	100	106,656	105,528	90,064	81,541	64,407

Componente C

N-Acetil-L-carnitina (mg/ml)	0	0,25	0,5	1	2	4
Vitalidad celular (%)	100	102,221	97,615	90,355	91,422	60,848

10

Tal como puede observarse a partir de la tabla 6, la concentración máxima no citotóxica de los componentes del complemento en comparación con la línea celular de monocitos humanos usada está órdenes de magnitud variables por debajo de las concentraciones de los componentes presentes en el complemento alimenticio disueltos en 50 ml.

15

Tabla 6. Concentración de cada componente del comprimido disuelto en 50 ml y concentración máxima no citotóxica.

COMPONENTE	mg/comprimido	mg/ml en 50 ml finales	Concentración máxima no citotóxica (mg/ml)	DF
Cúrcuma	150	3	0,0075	400
Ácido lipoico	300	6	0,3750	16
Vitamina C	125	2,5	0,1565	16
Acetato de vitamina E	9	0,18	0,0113	16
N-Acetil-L-carnitina	400	8	2	4

20

\*DF: factor de dilución aplicado

Para investigar la sinergia entre los diversos componentes, fue necesario tener en cuenta la alta citotoxicidad de cúrcuma; la primera concentración no citotóxica igual a 0,0075 mg/ml es de hecho 400 inferior a los 3 mg/ml obtenidos disolviendo el comprimido en 50 ml de disolvente. Este valor es muy próximo a la concentración no citotóxica encontrada para curcumina (Sigma, comercial) en el artículo de Hsu H.Y., Chu L., Hua K., *et al.*, 2008 Haem oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect on curcumin within LPS-stimulated human monocytes. Cell Physiol; 215: 603-612. Esto se refiere a un estudio realizado con el mismo modelo experimental (la línea celular THP-1): 10 µM en comparación con 20 µM de lo sometido a prueba en los presentes experimentos.

25

Para evaluar la posible citotoxicidad de la mezcla, se sometieron a prueba diluciones sucesivas de cada componente (A - B - C) y de la mezcla (A + B + C), manteniendo en esta última las proporciones en las que están presentes los diversos componentes en el complemento alimenticio, tal como puede observarse en la tabla 7 y la figura 8.

30

Tabla 7. Concentraciones (mg/ml) sometidas a prueba para los componentes individuales y para la mezcla, comenzando a partir de la más concentrada (columna número 5) y realizando diluciones escalares de 1:2.

35

COMPONENTE		1	2	3	4	5
A	Cúrcuma	0,0009	0,0019	0,00375	0,0075	0,015
B	Ácido lipoico	0,001875	0,00375	0,0075	0,015	0,03
	Vitamina C	0,0008	0,0016	0,00313	0,00625	0,0125
	Acetato de vitamina E	0,00006	0,000113	0,000225	0,00045	0,0009
C	N-Acetil-L-carnitina	0,0025	0,005	0,01	0,02	0,04

La figura 8 muestra un gráfico relacionado con la vitalidad celular de los componentes individuales y de la mezcla, expresada como porcentaje con respecto al control (células sin tratar), en función de concentraciones crecientes de los componentes A, B y C y de la mezcla (A + B + C).

40

Tal como puede observarse a partir del gráfico, se encuentra que los dos componentes B y C no son citotóxicos a cualquiera de las concentraciones sometidas a prueba (vitalidad celular superior al 70%). Específicamente, puede

observarse que la misma concentración que demostró no ser citotóxica para el componente A (0,0075 mg/ml) demostró serlo cuando se añadió a los otros dos componentes, llevando la primera concentración no citotóxica (vitalidad celular = 97,89%) de cúrcuma a 0,00375 mg/ml. La tabla 8 muestra las concentraciones relativas de los componentes B y C en el mismo punto.

5 Tabla 8. Concentraciones no citotóxicas notificadas para cada componente cuando se sometieron a prueba juntos (A + B + C).

A + B + C	Concentración no citotóxica (mg/ml)
Cúrcuma	0,00375
Ácido lipoico	0,00750
Vitamina C	0,00313
Acetato de vitamina E	0,00023
N-Acetil-L-carnitina	0,01000

## 10 Actividad antioxidante

Se evaluó la acción antioxidante de los componentes individuales de Xinepa y la sinergia midiendo las ROS producidas como resultado de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El parámetro considerado es MFI, intensidad de fluorescencia media, es decir la media geométrica de la intensidad de fluorescencia de las células en las que H<sub>2</sub>DCF-DA se ha transformado en la forma de DCF tratada con fluoresceína, que es proporcional a la cantidad de ROS por muestra. Se evaluó la fluorescencia de referencia usando células THP-1 no incubadas con H<sub>2</sub>DCF-DA (blanco); se usaron células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en medio libre de suero durante 2 horas como control positivo. Después se incubaron células, tratadas previamente (24 h) con los componentes individuales o con la mezcla, con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en medio libre de suero durante 2 horas y se procesaron para la investigación de ROS.

20 La figura 9 proporciona los resultados expresados como porcentaje, con respecto al control positivo (expresado como el 100%).

25 Los resultados obtenidos demuestran que el componente A (cúrcuma) sometido a prueba a una concentración de 0,00375 mg/ml provoca una reducción en la producción de ROS tras el tratamiento durante 24 horas y después tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> igual al 15,15%. Esta reducción era estadísticamente significativa (\* p = 0,05) con respecto al control. Tras el tratamiento con los componentes B y C a las concentraciones indicadas en la tabla 7, los niveles de ROS son comparables a los del control positivo (Ctrl+).

30 Estos datos concuerdan con datos en la bibliografía: de hecho, se ha demostrado la actividad antioxidante de cúrcuma en la misma línea celular. Sin embargo, la actividad antioxidante de los otros componentes en células THP-1 no se ha notificado en la bibliografía.

35 Los datos relacionados con la actividad antioxidante de los tres componentes combinados (A + B + C) fueron muy interesantes; tal como se muestra en el gráfico, la disminución de la producción de ROS tras el tratamiento durante 24 horas y después tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es igual al 48,62%. Esta reducción fue estadísticamente significativa (\*\*p≤0,01) tanto con respecto al control como con respecto a los componentes A, B y C tomados de manera individual. De hecho, la disminución de la producción de ROS es mucho mayor que la registrada para los componentes tomados de manera individual, lo que indica un efecto sinérgico igual a tres veces el valor individual para cúrcuma.

## Conclusiones

45 Los resultados obtenidos muestran que, en conjunto, los componentes A, B y C del producto Xinepa provocan una disminución de las especies reactivas de oxígeno. Esta reducción es estadísticamente significativa tanto con respecto al control como con respecto a los componentes individuales (más de tres veces con respecto a los componentes individuales). Por tanto, se ha demostrado la sinergia en la actividad contra radicales libres. Específicamente, los tres componentes investigados que constituyen Xinepa son: cúrcuma, ácido lipoico, vitamina C, acetato de vitamina E y N-acetil-L-carnitina. Estos se sometieron a prueba a concentraciones no citotóxicas, manteniendo las proporciones presentes en el complemento alimenticio.

## EJEMPLO 3. INVESTIGACIÓN DE LA SINERGIA ANTIINFLAMATORIA ENTRE LOS COMPONENTES DE UN COMPLEMENTO ALIMENTICIO EN CULTIVOS CELULARES DE MONOCITOS HUMANOS (THP-1)

55 El propósito del ensayo es evaluar el potencial antiinflamatorio de los componentes individuales del complemento alimenticio Xinepa y la posible sinergia entre los mismos, midiendo los niveles de IL1-β y TNFα, dos citocinas implicadas en los procesos inflamatorios y procesos del sistema inmunitario, en una línea celular de monocitos humanos (THP-1). Para determinar las concentraciones no citotóxicas del producto en cuestión, se usó un ensayo colorimétrico (ensayo de MTT) como prueba preliminar.

La tabla 9 a continuación muestra la composición del producto usado en el ensayo en cuestión.

Tabla 9

5

Sustancia	mg/dosis (1 comprimido)
Cúrcuma	150,00
Ácido lipoico	300,00
Vitamina C	125,00
Acetato de vitamina E	9,00
N-Acetil-L-carnitina	400,00
Vitamina B1	6,25
Vitamina B2	6,25
Vitamina B6	6,25
Vitamina B12	6,25

Se investigaron los siguientes componentes individuales:

- COMPONENTE A: cúrcuma

10

- COMPONENTE B: ácido lipoico, vitamina C, acetato de vitamina E

- COMPONENTE C: N-acetil-L-carnitina

15

Teniendo en cuenta que el complemento alimenticio entra en contacto con el tracto gastrointestinal, se supuso que en el estómago el comprimido puede disolverse por la acción de los jugos gástricos en un volumen de aproximadamente 50 ml, conduciendo a una concentración final de los componentes igual a la facilitada en la tabla 10.

20

El componente C no provocó problemas de disolución en medio RPMI con adición del 10% de suero bovino fetal (FBS), L-glutamina 2 mM y antibióticos (penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 100 µg/ml) (medio completo). En cambio, cúrcuma y ácido lipoico, que tienen solubilidades muy bajas en disolución acuosa, se disolvieron previamente en dimetilsulfóxido (DMSO) y después se diluyeron en medio completo, de tal manera que el porcentaje de disolvente presente no era superior al 0,2%, una concentración que se sabe que no es citotóxica.

25

Tabla 10. Concentración de los componentes de Xinepa suponiendo una disolución completa en 50 ml.

Componente	Sustancia	mg/dosis (un comprimido)	Concentración (mg/ml)*
A	Cúrcuma	150,00	3,00
B	Ácido lipoico	300,00	6,00
	Vitamina C	125,00	2,50
	Acetato de vitamina E	9,00	0,18
C	N-Acetil-L-carnitina	400,00	8,00

\*Valores relacionados con los componentes individuales suponiendo un volumen de 50 ml

30

Cultivos celulares

Se llevaron a cabo las pruebas con monocitos humanos THP-1 (número de ATCC: TIB-202™).

35

Se cultivaron las células THP-1 en medio completo (indicado anteriormente) y en condiciones de esterilidad completa (a 37°C con atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5%).

Ensayo de citotoxicidad

40

El ensayo de MTT es un ensayo de citotoxicidad colorimétrico que hace posible someter a prueba la proliferación y vitalidad celulares basándose en la eficiencia de respiración mitocondrial. MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio) es una sal de tetrazolio que se reduce por el entorno altamente reductor en las mitocondrias de células vivas mediante la acción de deshidrogenasa mitocondrial. La reducción de MTT conduce a la formación de cristales de formazán que confieren la coloración púrpura característica a las mitocondrias de células vivas. En cambio, en células muertas o células alteradas, que por tanto tienen mitocondrias inactivas, MTT no se reducirá, con una consiguiente coloración púrpura menos intensa o ausente (Mosmann T., 1983 Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods.; 65: 55-63). Por tanto, aunque es una prueba que evalúa la respiración celular, se considera que el ensayo de MTT es un método excelente para determinar la vitalidad celular. Por este motivo, se usó como análisis preliminar para determinar las

45

concentraciones no citotóxicas de los componentes individuales del complemento alimenticio Xinepa y de una mezcla de los mismos con el propósito de obtener aquellas que son útiles para el ensayo de ROS.

5 Como preparación para la prueba, se sembraron las células de manera uniforme en placas de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células por pocillo y se incubaron a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5% y al mismo tiempo se trataron las células con diluciones en serie (1:2) con el fin de identificar la concentración máxima no citotóxica para cada componente.

10 Se llevó a cabo el tratamiento durante 24 horas. Al final, tras un breve lavado en PBS, se añadieron 20 µl de MTT (disolución madre, 5 mg/ml) en PBS a las células THP-1 durante 2 horas a 37°C. Al final del tiempo de incubación, tras retirada del medio y lavado en PBS, se añadieron 100 µl de DMSO para disolver los cristales de formazán. Se realizó una lectura espectrofotométrica con un lector de microplacas (Tecan Sunrise) a una longitud de onda de 570 nm. Se calculó la vitalidad celular midiendo la densidad óptica de las concentraciones sometidas a prueba con respecto al control (células sin tratar).

15 **Análisis de la actividad antiinflamatoria**

Se evaluó la posible actividad antiinflamatoria de los componentes individuales y sinergia entre los mismos en células THP-1 tras 24 horas de tratamiento y estimulación con un agente proinflamatorio conocido (LPS), midiendo la expresión de IL-1β y TNFα usando un kit de ELISA (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

20 Como preparación para la prueba, se sembraron las células THP-1 de manera uniforme en una placa de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pocillo y se trataron con las concentraciones máximas que se encontró que no eran citotóxicas en el ensayo de MTT; se usaron células sin tratar como control negativo. Se llevó a cabo el tratamiento a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% durante 20 h; después se estimuló la muestra con LPS (componente de la membrana exterior bacteriana, que se considera que es un agente inflamatorio) durante 4 horas.

25 Al final del tratamiento, se recogieron los sobrenadantes y se usaron para recubrir una placa de ELISA previamente tratada, suministrada con el kit.

30 Para el análisis de la expresión de ambos marcadores que están examinándose (IL-1β y TNFα), se usa un kit especial que se basa en el sistema de ELISA tipo “sándwich” en el que se recubre una placa de 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal específico para la citocina particular.

35 Se añaden los patrones, preparados basándose en la instrucciones en el protocolo y usados para construir la curva de calibración, y las muestras a los pocillos y la citocina de interés se une al anticuerpo de captura inmovilizado sobre el fondo del pocillo. A continuación, se añade el anticuerpo anti-citocina biotinilado a los pocillos de modo que se forma el “sándwich” de anticuerpo biotinilado-antígeno-anticuerpo. Se realiza un seguimiento de esto mediante peroxidasa de rábano conjugada con estreptavidina y una disolución de tetrametilbencidina (TMB) que, al reaccionar con el peróxido, produce un compuesto de color azul, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de citocina presente. La adición de una disolución de ácido sulfúrico hace que el color de la disolución pase de azul a amarillo, bloqueando la reacción y permitiendo una lectura precisa de la absorbancia de las muestras a 450 nm.

40 Después se leyó la absorbancia a 450 y 550 nm usando un lector de microplacas (Tecan Sunrise). Los valores obtenidos a partir de la lectura a 550 nm se restaron de aquellos a 450 nm para corregir las imperfecciones ópticas de la microplaca.

**Análisis estadístico**

45 A la vista del pequeño número de datos que iban a analizarse, se usó un método de análisis no paramétrico, adecuado para una distribución no normal (no gaussiana) de los valores. Por tanto, para evaluar los datos presentados en este informe, se seleccionó la prueba de Kruskal-Wallis. La prueba de Kruskal-Wallis se realiza con datos ordenados y es útil para comparar tres o más grupos, para evaluar si la mediana de los rangos de las variables medidas es igual en todos los grupos.

50 Para realizar la prueba, se usó una hoja de datos de Excel, generada por el Prof. J. H. McDonald (universidad de Delaware), disponible en la 3ª edición en línea de su Manual of Biological Statistics (<http://www.biostathandbook.com/kruskalwallis.html>).

55 **Resultados**

Los resultados obtenidos se facilitan en forma de tabla y gráfica que contiene las medidas de vitalidad celular (ensayo de MTT) y posible actividad antiinflamatoria como resultado del tratamiento con los componentes individuales del producto Xinepa o a partir de la sinergia de los mismos.

60 **Vitalidad celular**

Se incubaron células THP-1 (tiempo de tratamiento de 24 horas) con diferentes concentraciones de los componentes individuales con el propósito de identificar las concentraciones que no provocan una mortalidad celular mayor del 30%. A partir de los resultados obtenidos, los componentes individuales mostraron un intervalo variable de citotoxicidad; la tabla 11 proporciona el intervalo sometido a prueba para cada componente (5 concentraciones con diluciones sucesivas de 1:2) dentro del cual es posible identificar la concentración máxima no citotóxica.

Tabla 11. Intervalo de concentración sometido a prueba para cada sustancia.

COMPONENTE	SUSTANCIA	INTERVALO SOMETIDO A PRUEBA (mg/ml)
A	Cúrcuma	0,03-0,0019
B	Ácido lipoico	0,75-0,0469
	Vitamina C	0,313-0,0196
	Acetato de vitamina E	0,0225-0,0014
C	N-Acetil-L-carnitina	4-0,25

La figura 10 muestra el gráfico relacionado con la vitalidad celular de los tres componentes, expresada como porcentaje con respecto al control (células sin tratar), en función de concentraciones crecientes de los componentes A, B y C.

La tabla 12 proporciona los datos expresados como porcentaje. Las vitalidades mínimas consideradas aceptables están en rojo.

Tabla 12. Vitalidad celular expresada como porcentaje para cada componente.

Componente A

Cúrcuma (mg/ml)	0	0,0019	0,0038	0,0075	0,015	0,03
Vitalidad celular (%)	100	102,093	100,571	80,195	37,675	15,814

Componente B

Ácido lipoico (mg/ml)	0	0,0469	0,0938	0,1875	0,375	0,75
Vitamina C (mg/ml)	0	0,0196	0,0391	0,0783	0,1565	0,313
Acetato de vitamina E (mg/ml)	0	0,0014	0,0028	0,0056	0,0113	0,0225
Vitalidad celular (%)	100	106,656	105,528	90,064	81,541	64,407

Componente C

N-Acetil-L-carnitina (mg/ml)	0	0,25	0,5	1	2	4
Vitalidad celular (%)	100	102,221	97,615	90,355	91,422	60,848

Tal como puede observarse a partir de la tabla 13, la concentración máxima no citotóxica de los componentes del complemento con respecto a la línea celular de monocitos humanos usada es diversos órdenes de magnitud inferior a las concentraciones de los componentes presentes en el complemento alimenticio disuelto en 50 ml.

Tabla 13. Concentración de cada componente del comprimido disuelto en 50 ml y concentración máxima no citotóxica.

COMPONENTE	mg/comprimido	mg/ml en 50 ml finales	Concentración máxima no citotóxica (mg/ml)	DF
Cúrcuma	150	3	0,0075	400
Ácido lipoico	300	6	0,3750	16
Vitamina C	125	2,5	0,1565	16
Acetato de vitamina E	9	0,18	0,0113	16
N-Acetil-L-carnitina	400	8	2	4

\*DF: factor de dilución aplicado

Para investigar la sinergia entre los diversos componentes, fue necesario tener en cuenta la alta citotoxicidad de cúrcuma; la primera concentración no citotóxica, igual a 0,0075 mg/ml, es de hecho 400 veces inferior a los 3 mg/ml obtenidos disolviendo el comprimido en 50 ml de disolvente. Este valor es muy próximo a la concentración no citotóxica encontrada para curcumina (Sigma, comercial) en un trabajo de Hsu *et al.* (Hsu H.Y. *et al.*, 2008) realizado con el mismo modelo experimental (línea celular THP-1): 10 µM en comparación con 20 µM de lo sometido a prueba en los experimentos de los presentes inventores.

Para evaluar la posible citotoxicidad de la mezcla, se sometieron a prueba diluciones sucesivas de cada componente (A - B - C) y de la mezcla (A + B + C), manteniendo en esta última las proporciones en las que están presentes los diversos componentes en el complemento alimenticio, tal como puede observarse en la tabla 14 y la figura 11.

5 Tabla 14. Concentraciones (mg/ml) sometidas a prueba para los componentes individuales y para la mezcla, comenzando a partir de la más concentrada (columna número 5) y realizando diluciones escalares de 1:2.

COMPONENTE		1	2	3	4	5
A	Cúrcuma	0,0009	0,0019	0,00375	0,0075	0,015
B	Ácido lipoico	0,001875	0,00375	0,0075	0,015	0,03
	Vitamina C	0,0008	0,0016	0,00313	0,00625	0,0125
	Acetato de vitamina E	0,00006	0,000113	0,000225	0,00045	0,0009
C	N-Acetil-L-carnitina	0,0025	0,005	0,01	0,02	0,04

10 La figura 11 muestra el gráfico relacionado con la vitalidad celular de los componentes individuales y de la mezcla, expresada como porcentaje con respecto al control (células sin tratar), en función de concentraciones crecientes de los componentes A, B y C y de la mezcla (A + B + C).

15 Tal como puede observarse a partir del gráfico, se encuentra que los dos componentes B y C no son citotóxicos a cualquiera de las concentraciones sometidas a prueba (vitalidad celular por encima del 70%). Específicamente, puede observarse que la misma concentración que demostró no ser citotóxica para el componente A (0,0075 mg/ml) no fue citotóxica cuando se añadió a los otros dos componentes, llevando la primera concentración no citotóxica (vitalidad celular = 97,89%) de cúrcuma a 0,00375 mg/ml. La tabla 15 muestra las concentraciones relativas de los componentes B y C en el mismo punto.

20 Tabla 15. Concentraciones no citotóxicas notificadas para cada componente cuando se someten a prueba juntos (A + B + C).

25

A + B + C	Concentración no citotóxica (mg/ml)
Cúrcuma	0,00375
Ácido lipoico	0,00750
Vitamina C	0,00313
Acetato de vitamina E	0,00023
N-Acetil-L-carnitina	0,01000

#### Actividad antiinflamatoria

30 Se evaluaron la actividad antiinflamatoria de los componentes individuales de Xinepa y la sinergia midiendo dos citocinas implicadas en el proceso inflamatorio e inmunitario.

35 Los dos marcadores analizados son IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , ambos de los cuales son capaces de inducir la expresión de otros mediadores proinflamatorios y están implicados en el desarrollo de dolor neuropático; por esos motivos, se seleccionaron para analizar la actividad antiinflamatoria de los componentes de Xinepa, con, como diana patológica, dolor neuropático procedente de traumatismo o procedente de un efecto inflamatorio.

#### Evaluación de la expresión de IL-1 $\beta$

40 Se evaluaron la posible acción antiinflamatoria de los componentes individuales de Xinepa y la posible sinergia midiendo los niveles de IL-1 $\beta$  tras la estimulación con LPS. El control negativo está representado por células que no se trataron y no se estimularon; se incubaron células, previamente tratadas (20 h) con los componentes individuales o con la mezcla, con LPS durante 4 horas y se recogió el sobrenadante para evaluar los niveles de interleucina.

45 La figura 12 muestra los niveles de IL-1 $\beta$  en células tratadas con los diversos componentes y con la mezcla tras la estimulación con el agente proinflamatorio.

La tabla 16 presenta los valores de concentración de IL-1 $\beta$  (pg/ml).

50 Tanto en la figura 12 como en la tabla 16, los valores se facilitan como media  $\pm$  desviación estándar de las concentraciones derivadas a partir de los valores de absorbancia de las muestras (realizado por duplicado y leído por triplicado), interpolándolos con la curva estándar siguiendo las instrucciones suministradas por la empresa.

Tabla 16. Valores de IL-1 $\beta$  en células THP-1 tras el tratamiento con los componentes individuales A, B y C o la

mezcla A + B + C (n = 1; repeticiones = 2, placas leídas tres veces).

Muestra	Ctrl	Ctrl + LPS	A	B	C	A + B + C
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	3,71 $\pm$ 0,029	4,84 $\pm$ 0,032	4,05 $\pm$ 0,028	6,44 $\pm$ 0,029	4,98 $\pm$ 0,059	3,73 $\pm$ 0,394

5 La figura 13 muestra los niveles expresados como porcentaje, con respecto a células estimuladas sin tratar (Ctrl + LPS), tras 24 horas de tratamiento con los tres componentes y con la mezcla A + B + C.

La tabla 17 presenta estos valores junto con sus desviaciones estándar.

10 Tabla 17. Valores de IL-1 $\beta$  en células THP-1 tras el tratamiento con los componentes individuales A, B y C o la mezcla A + B + C (n = 1; repeticiones = 2, placas leídas tres veces).

Muestra	Ctrl + LPS	A	B	C	A + B + C
IL-1 $\beta$ (%)	100 $\pm$ 0,032	83,73 $\pm$ 0,8	133,20 $\pm$ 1,17	102,91 $\pm$ 1,58	77,04 $\pm$ 8,22

15 Los resultados obtenidos demuestran que los componentes B (ácido lipoico, vitamina C y acetato de vitamina E) y C (N-acetil-L-carnitina) provocan un aumento de los niveles de IL-1 $\beta$  tras el tratamiento durante 24 horas y estimulación con LPS.

20 El componente A muestra niveles inferiores al control estimulado. Estos datos concuerdan con datos en la bibliografía: de hecho se ha demostrado la actividad antiinflamatoria de cúrcuma en la misma línea celular (Giri R.K., Rajagopal V., Kalra V.K., 2004 Curcumin, the active constituent of turmeric, inhibits amiloid peptide-induced cytochemokine gene expression and CCR5-mediated chemotaxis of THP-1 monocytes by modulating early growth response-1 transcription factor. J Neurochem.; 91: 1199-210).

25 Los datos relacionados con la actividad antiinflamatoria de los tres componentes combinados (A + B + C) proporcionados en el gráfico indican una disminución de la producción de IL-1 $\beta$  tras el tratamiento durante 24 horas y después estimulación con LPS igual al 22,96%. Se encontró que esta disminución era estadísticamente significativa (prueba de Kruskal-Wallis, \*\*p $\leq$ 0,01) con respecto al control aunque no fuera estadísticamente significativa con respecto al componente A tomado de manera individual.

30 Evaluación de la expresión de TNF $\alpha$

35 Se evaluaron la posible acción antiinflamatoria de los componentes individuales de Xinepa y la posible sinergia midiendo los niveles de TNF $\alpha$  tras la estimulación con LPS. El control negativo está representado por células que no se trataron y no se estimularon; células tratadas previamente (24 h) con los componentes individuales o con la mezcla se incubaron después con LPS durante 4 horas y se recogió el sobrenadante para evaluar los niveles de interleucina.

La figura 14 muestra los niveles de TNF $\alpha$  en células tratadas con los diversos componentes y con la mezcla tras la estimulación con el agente proinflamatorio.

40 La tabla 18 presenta los valores de concentración de TNF $\alpha$  (pg/ml).

45 Tanto en la figura 14 como en la tabla 18, los valores se notifican como media  $\pm$  desviación estándar de las concentraciones derivadas a partir de los valores de absorbancia de las muestras (realizado por duplicado y leído por triplicado), interpolándolos con la curva estándar siguiendo las instrucciones proporcionadas por la empresa.

Tabla 18. Valores de TNF $\alpha$  en células THP-1 tras el tratamiento con los componentes individuales A, B y C o la mezcla A + B + C (n = 1; repeticiones = 2, placas leídas tres veces).

Muestra	Ctrl	Ctrl + LPS	A	B	C	A + B + C
TNF $\alpha$ (pg/ml)	3,51 $\pm$ 0,11	424,12 $\pm$ 1,67	446,26 $\pm$ 1,73	488,10 $\pm$ 2,24	386,98 $\pm$ 1,24	153,78 $\pm$ 0,06

50 La figura 15 muestra los niveles expresados como porcentaje, con respecto a células estimuladas sin tratar (Ctrl + LPS), tras 24 horas de tratamiento con los tres componentes y con la mezcla A + B + C.

La tabla 19 presenta estos valores junto con sus desviaciones estándar.

55 Tabla 19. Valores de TNF $\alpha$  en células THP-1 tras el tratamiento con los componentes individuales A, B y C o la mezcla A + B + C (n = 1; repeticiones = 2, placas leídas tres veces).

Muestra	Ctrl + LPS	A	B	C	A + B + C
---------	------------	---	---	---	-----------

TNF $\alpha$ (%)	100 $\pm$ 0,03	104,75 $\pm$ 0,01	115,09 $\pm$ 0,24	91,24 $\pm$ 0,22	36,26 $\pm$ 0,16
------------------	----------------	-------------------	-------------------	------------------	------------------

Los resultados obtenidos demuestran que los componentes A (cúrcuma) y B (ácido lipoico, vitamina C y acetato de vitamina E) provocan un ligero aumento de los niveles de TNF $\alpha$  tras el tratamiento durante 24 horas y la estimulación con LPS. El componente C muestra niveles inferiores al control estimulado.

5 Los datos relacionados con la actividad antiinflamatoria de los tres componentes combinados (A + B + C) fueron muy interesantes; tal como se muestra en el gráfico, la disminución de la producción de TNF $\alpha$  tras el tratamiento durante 24 horas y después estimulación con LPS es igual al 67,74%. Se encontró que esta disminución era estadísticamente significativa (prueba de Kruskal-Wallis, \*\*p $\leq$ 0,01) y mayor que la del componente C tomado de  
10 manera individual, lo que indica un efecto sinérgico de aproximadamente tres veces, proporcionado por los tres componentes combinados.

#### Conclusiones

15 Los resultados obtenidos muestran que, juntos, los tres componentes del complemento Xinepa provocan una reducción de la expresión de las citocinas inflamatorias analizadas. Se encontró que esta reducción era estadísticamente significativa, mayor que la producida por los componentes individuales, siendo particularmente evidente el factor de necrosis tumoral. Por tanto, se ha demostrado la sinergia antiinflamatoria del producto Xinepa. Específicamente, los tres componentes que constituyen Xinepa son: cúrcuma, ácido lipoico, vitamina C, acetato de  
20 vitamina E y N-acetil-L-carnitina. Éstos se sometieron a prueba a concentraciones no citotóxicas, manteniendo las proporciones presentes en el complemento alimenticio. El análisis de la expresión de la citocina TNF $\alpha$  tras la estimulación con LPS demostró el efecto sinérgico de los tres componentes, con una reducción de los niveles igual a aproximadamente el 68%, lo cual se encontró que era estadísticamente significativo, y mayor de tres veces. Se obtuvo un resultado similar analizando la citocina IL-1 $\beta$ , confirmando el efecto sinérgico de los componentes, aunque  
25 con una reducción menor, igual a aproximadamente el 25%.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica o complemento alimenticio que comprende, como principios activos, curcumina, éster acetílico de L-carnitina y ácido alfa-lipoico, para su uso en el tratamiento de neuropatías y/o dolor neuropático.
2. Composición farmacéutica o complemento alimenticio según la reivindicación 1, para su uso según la reivindicación 1, que comprende un extracto de *Curcuma longa* como fuente de curcumina.
- 10 3. Composición farmacéutica o complemento alimenticio según la reivindicación 2, para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho extracto de *Curcuma longa* tiene un título de curcumina del 95%.
- 15 4. Composición farmacéutica o complemento alimenticio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso según la reivindicación 1, en una forma de dosificación que comprende desde 350 hasta 500 mg de éster acetílico de L-carnitina, desde 250 hasta 400 mg de ácido alfa-lipoico y desde 100 hasta 500 mg de extracto de *Curcuma longa*.
- 20 5. Composición farmacéutica o complemento alimenticio según la reivindicación 4, para su uso según la reivindicación 1, en una forma de dosificación que comprende 400 mg de éster acetílico de L-carnitina, 300 mg de ácido alfa-lipoico y 150 mg de extracto de *Curcuma longa*.
- 25 6. Composición farmacéutica o complemento alimenticio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso según la reivindicación 1, que está en una forma de dosificación oral.
- 30 7. Composición farmacéutica o complemento alimenticio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso según la reivindicación 1, en la que la neuropatía se selecciona del grupo que consiste en neuropatía periférica, neuropatía postraumática inflamatoria, síndrome lumbociático, neuropatía metabólica diabética, neuropatía mecánica debida a compresión y atrapamiento nervioso (síndrome de túnel carpiano), neuropatía inducida por quimioterapia, neuropatía inducida por terapia antirretroviral, neuropatía por virus de zóster, neuropatía de nervio braquial debida a vacunación.
- 35 8. Composición farmacéutica o complemento alimenticio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso según la reivindicación 1 en administración oral, en la que dicho uso comprende la administración de desde 350 hasta 1000 mg/día de éster acetílico de L-carnitina, desde 250 hasta 800 mg/día de ácido alfa-lipoico y desde 100 hasta 1000 mg/día de extracto de *Curcuma longa*.
- 40 9. Composición farmacéutica o complemento alimenticio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso según la reivindicación 1, que comprende además una o más vitaminas seleccionadas del grupo que consiste en vitamina C, vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6 y vitamina B12.
10. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso según la reivindicación 1, que comprende además excipientes y/o aglutinantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

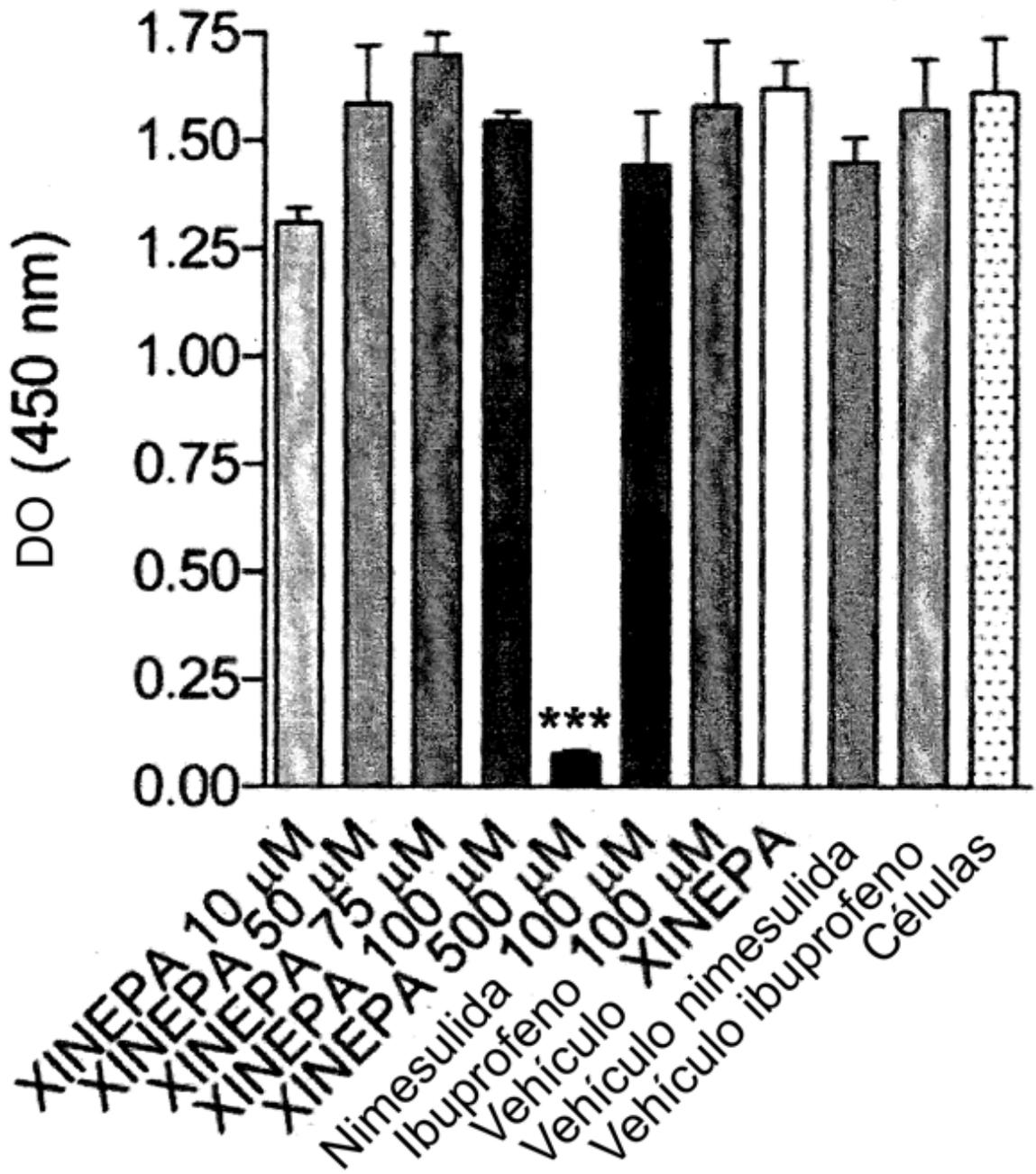


FIG. 1

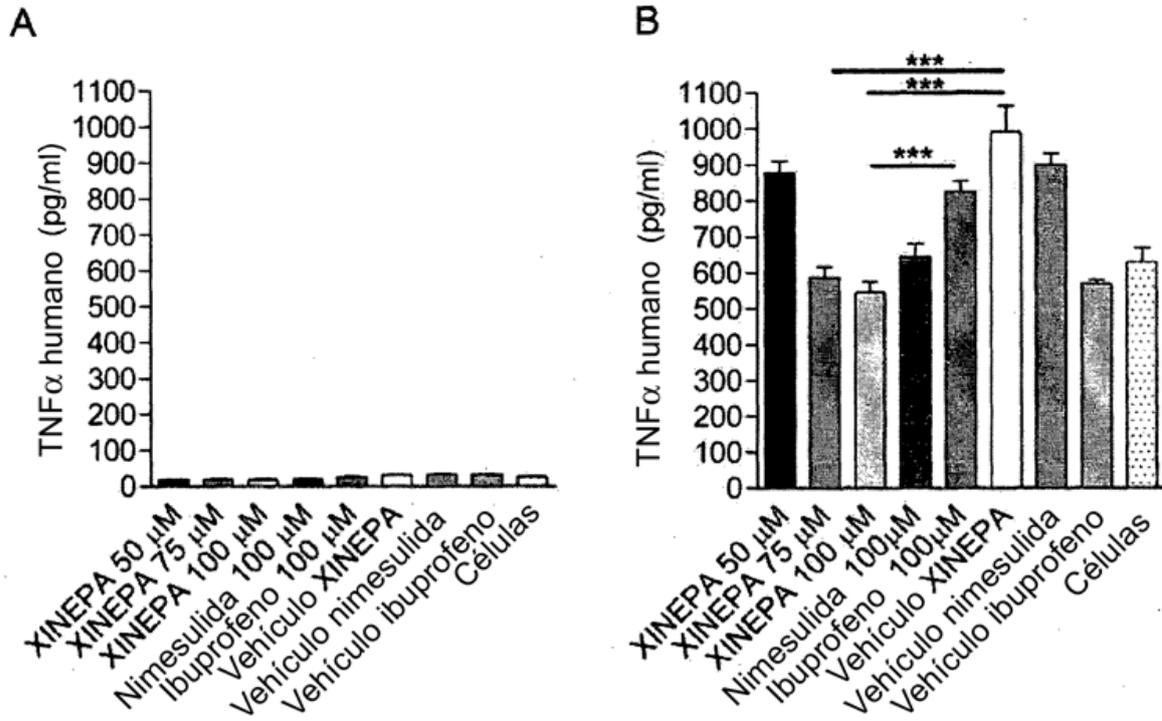


FIG. 2

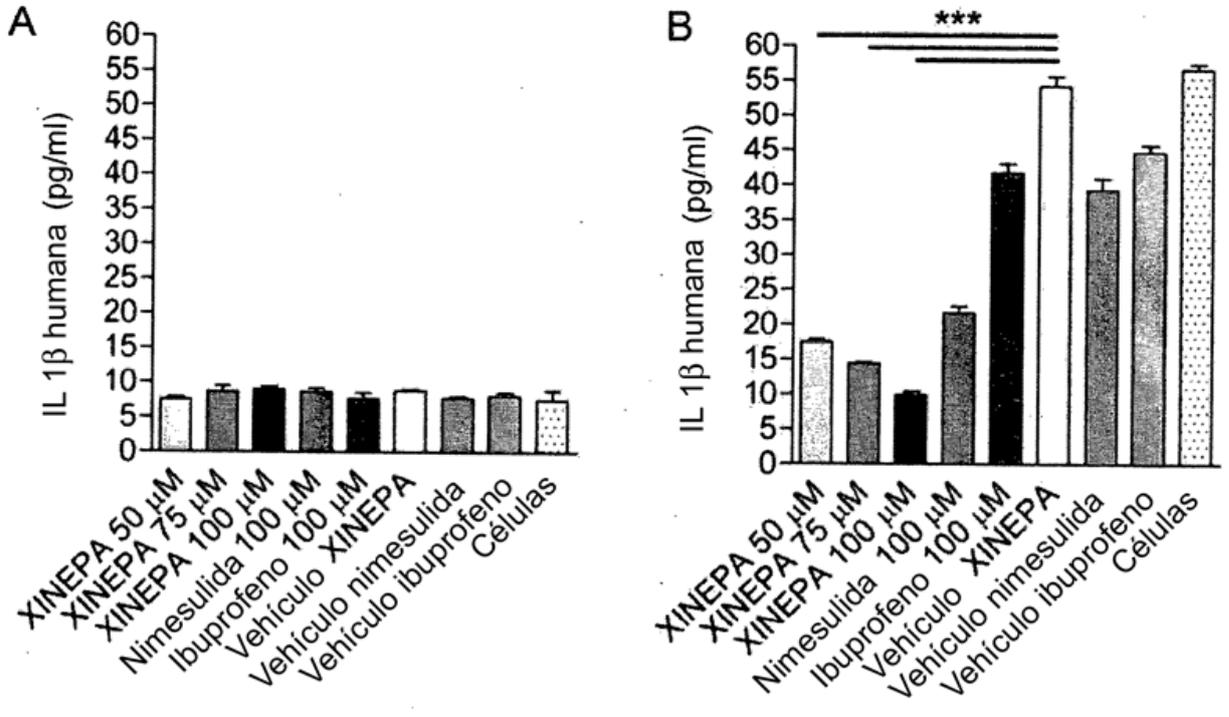


FIG. 3

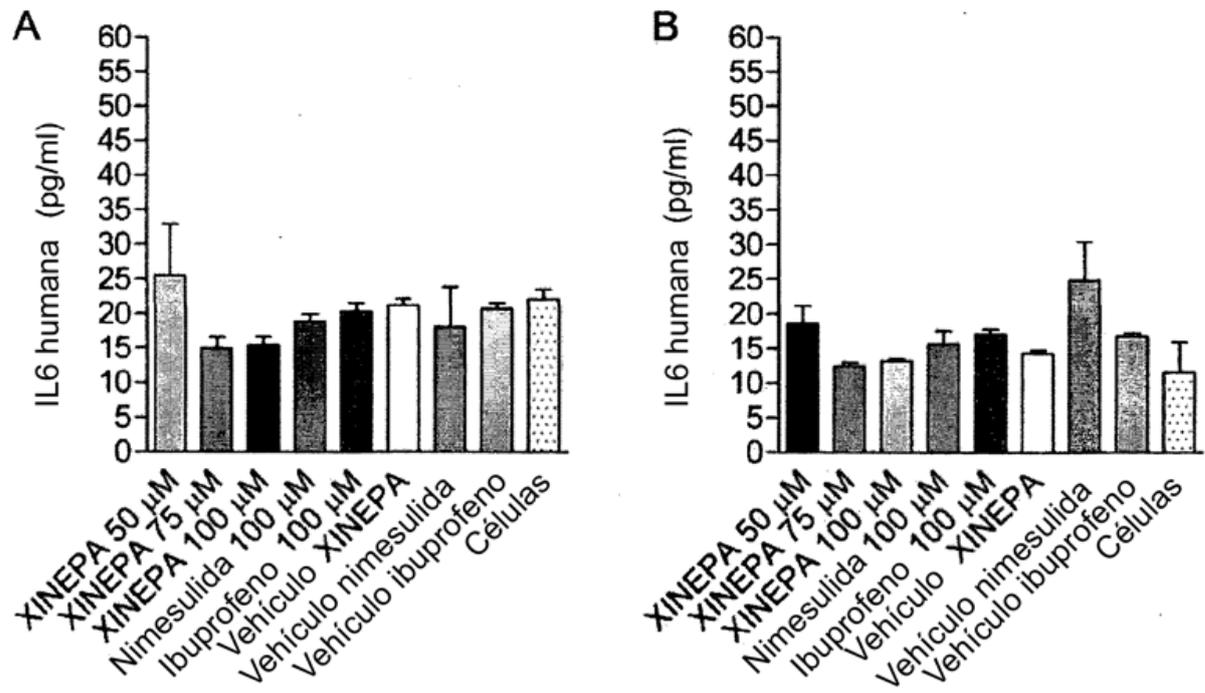


FIG. 4

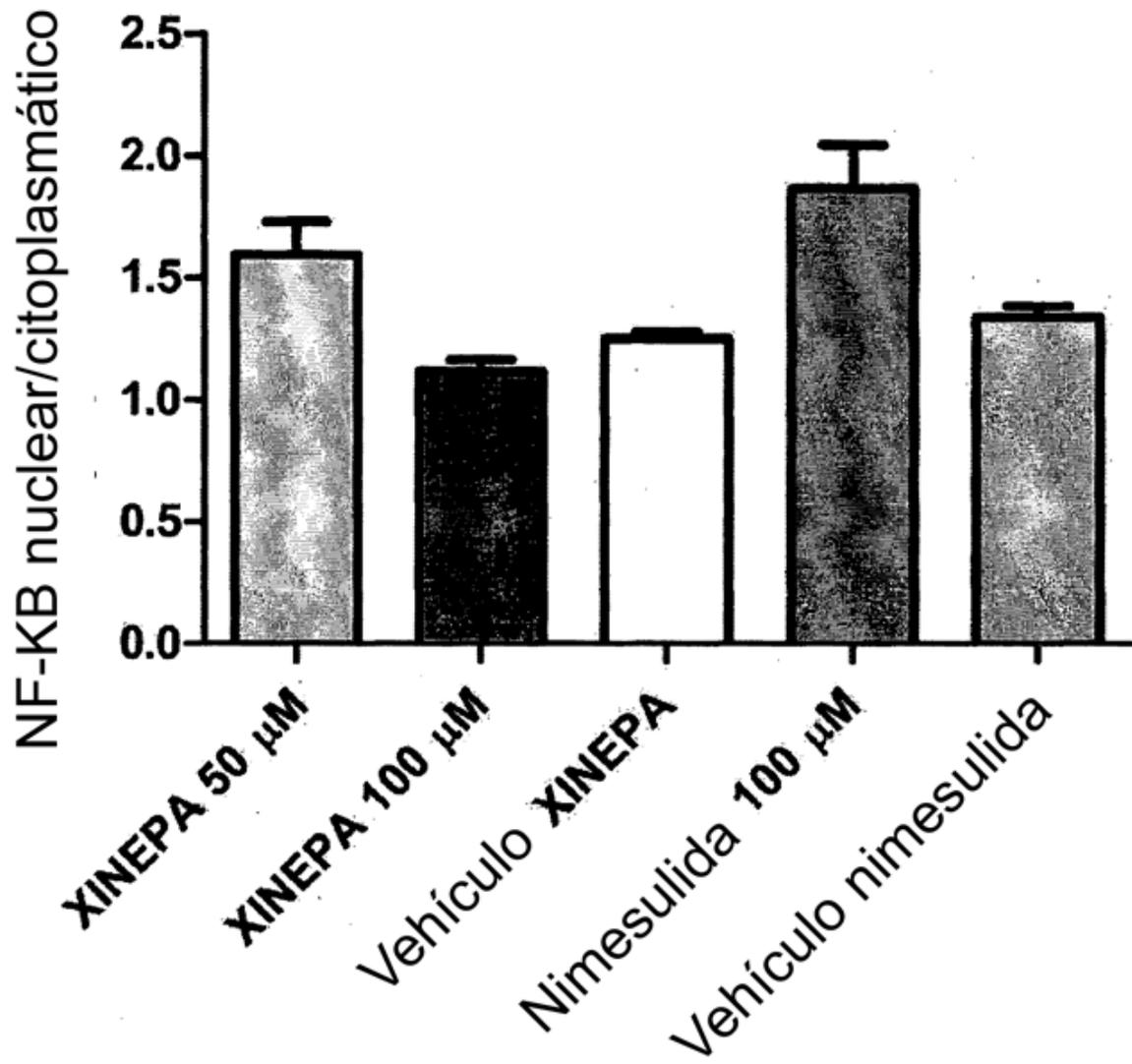


FIG. 5

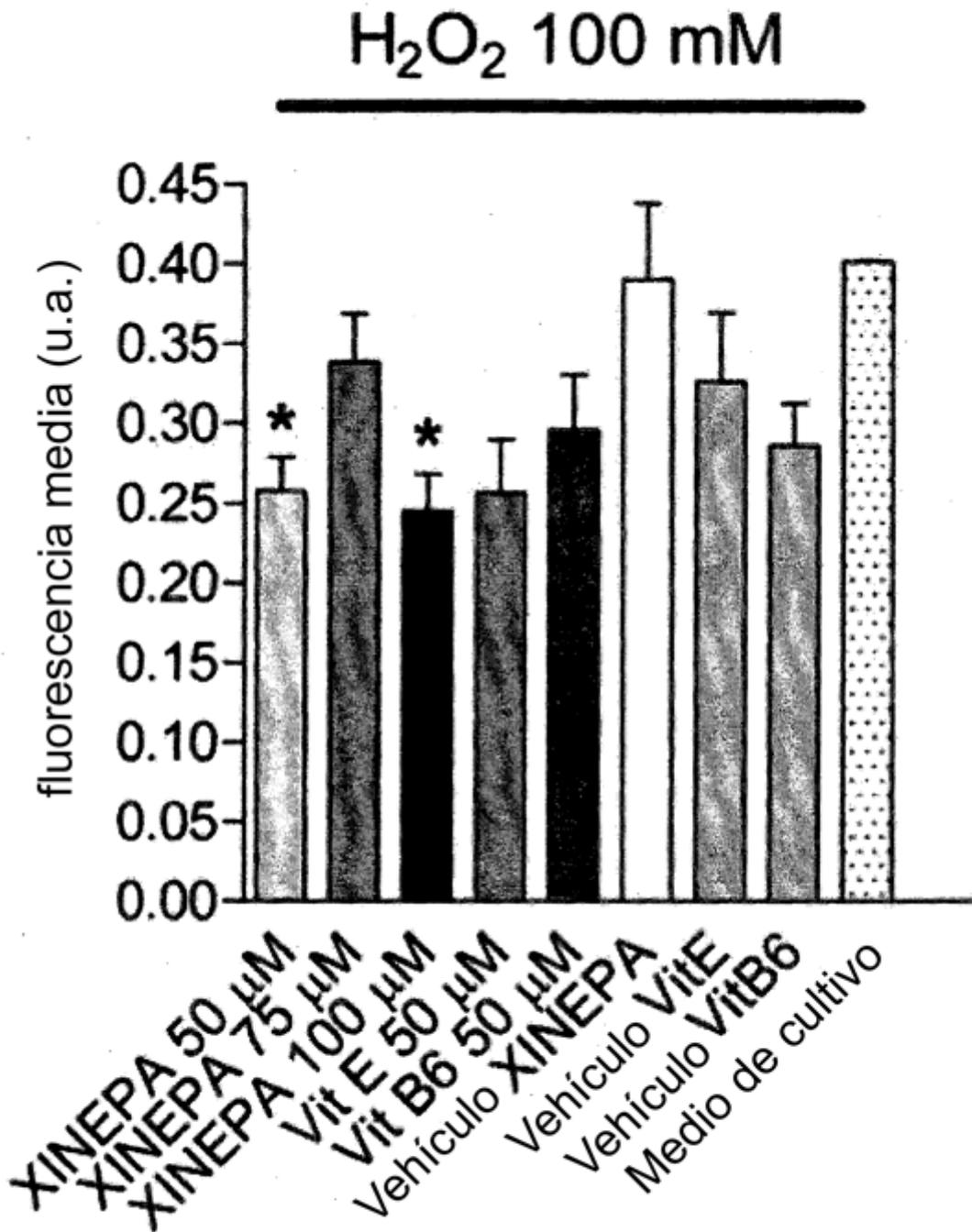


FIG. 6

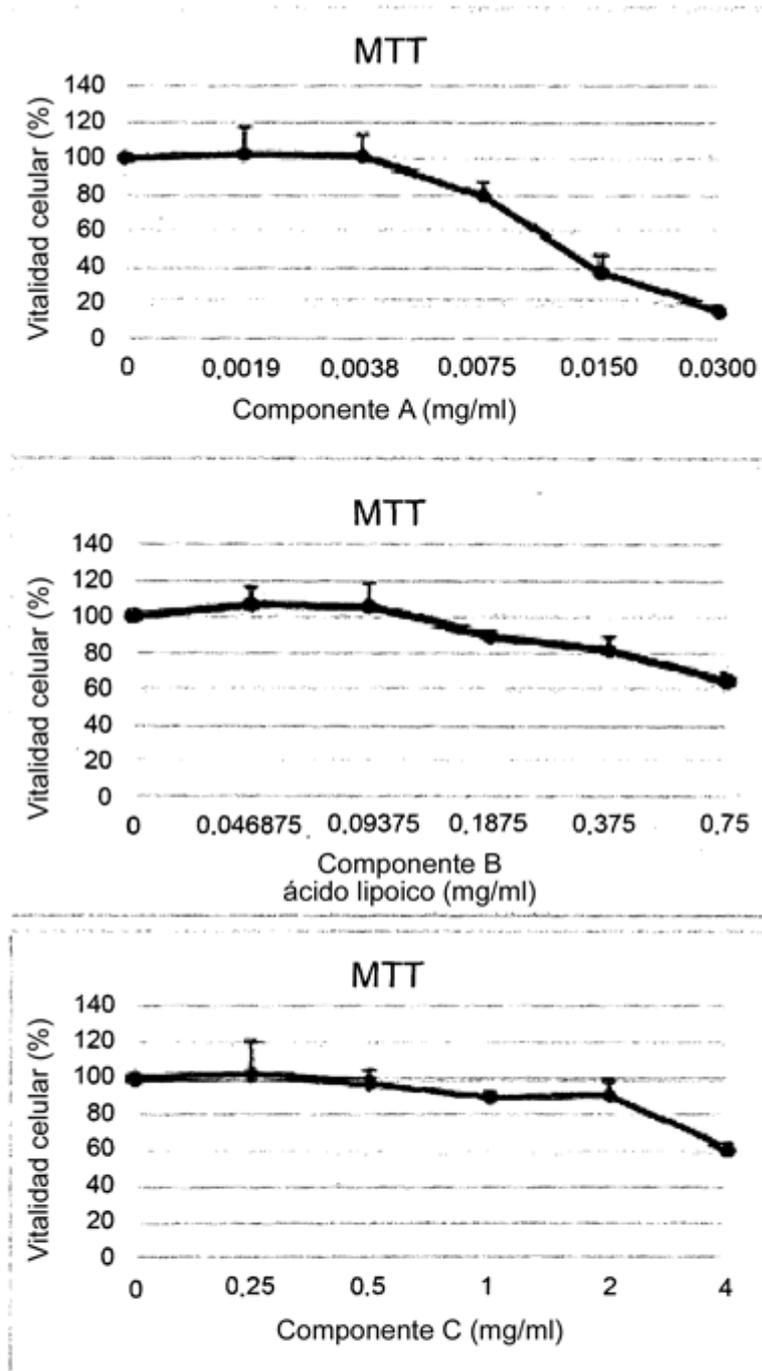


FIG.7

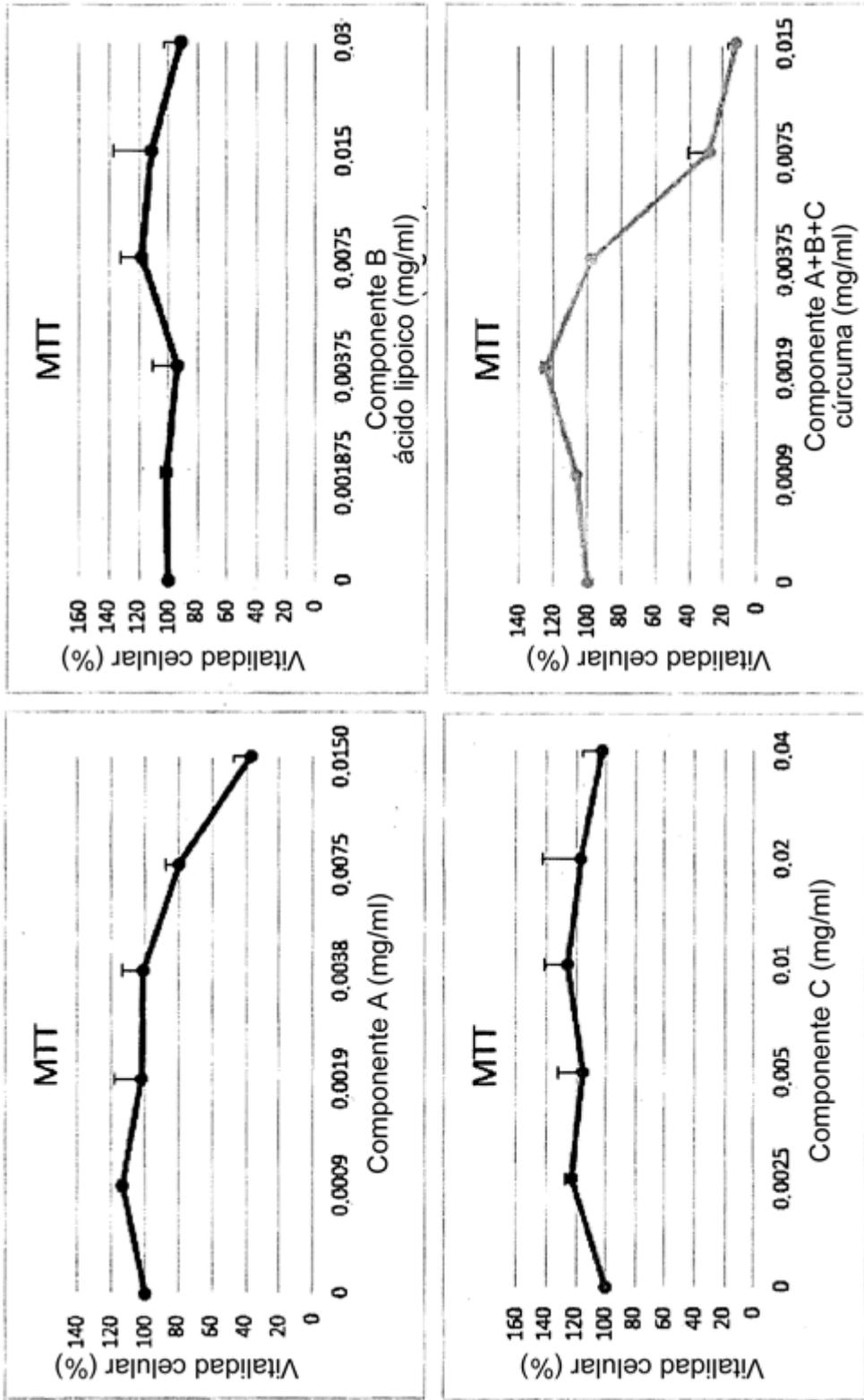


FIG.8

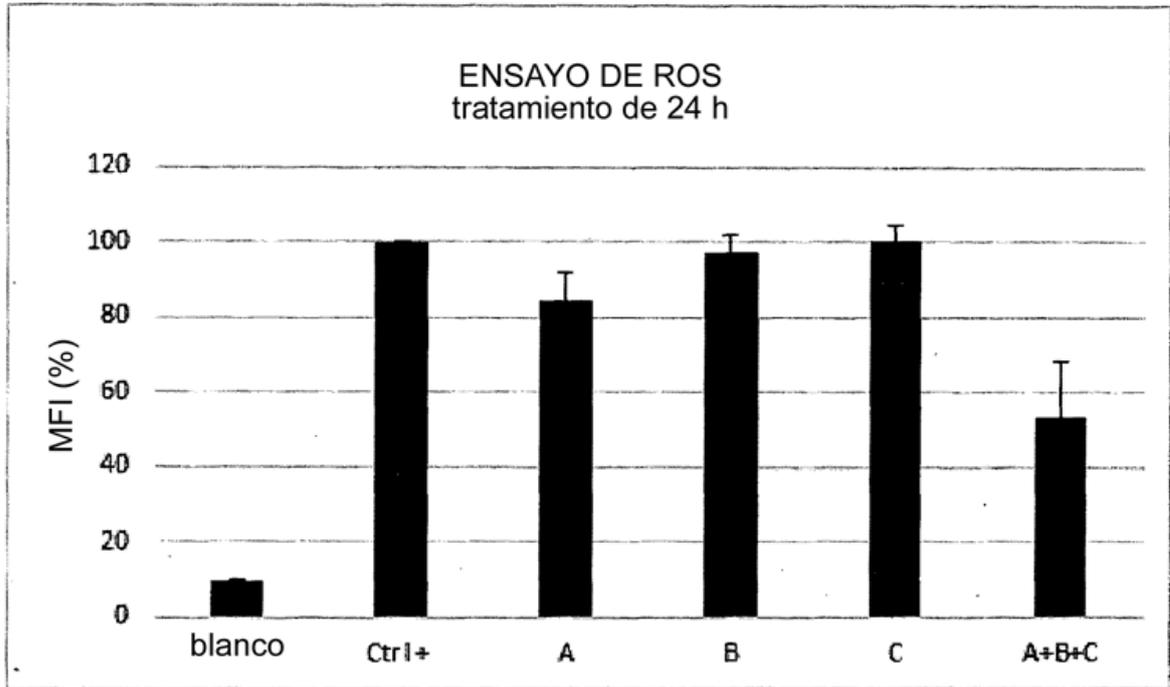


FIG.9

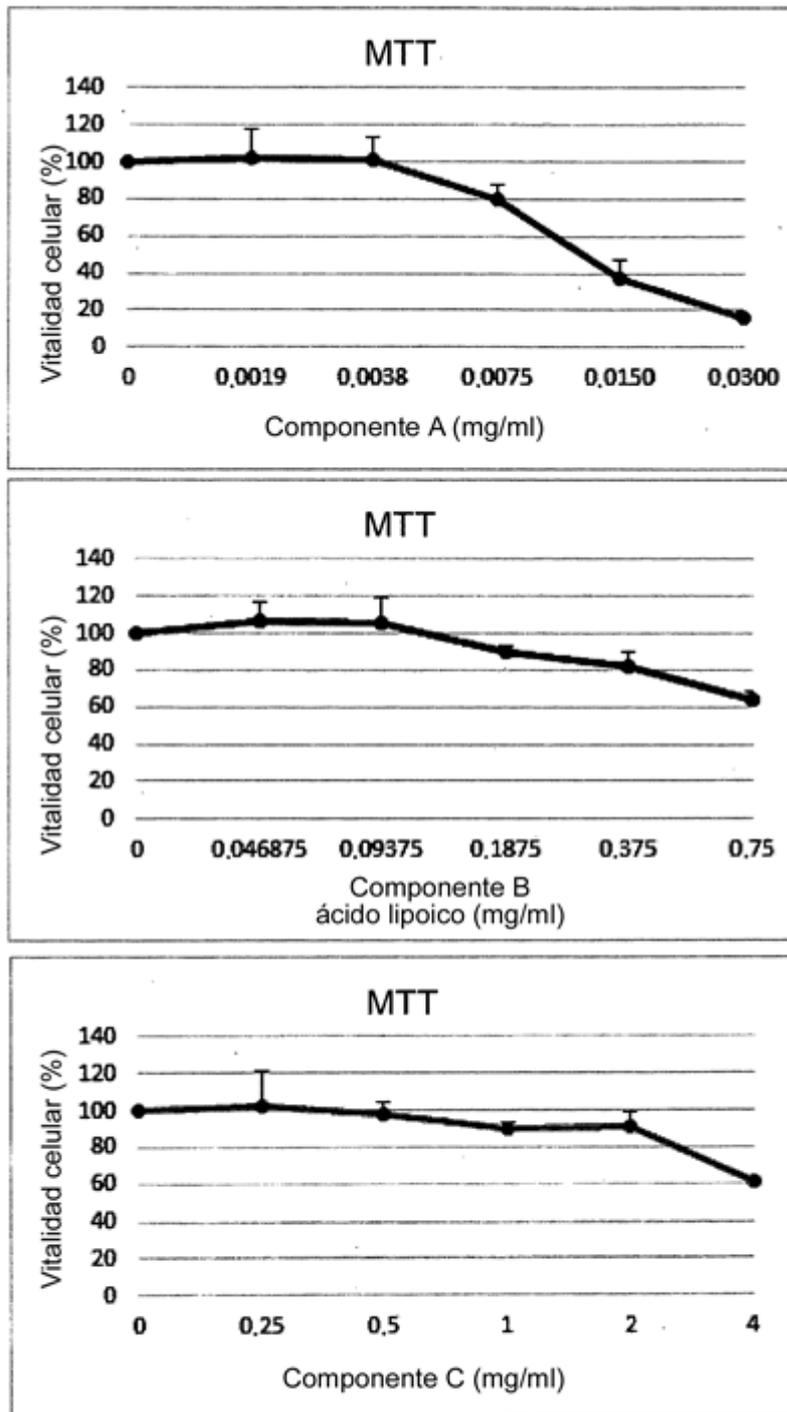


FIG.10

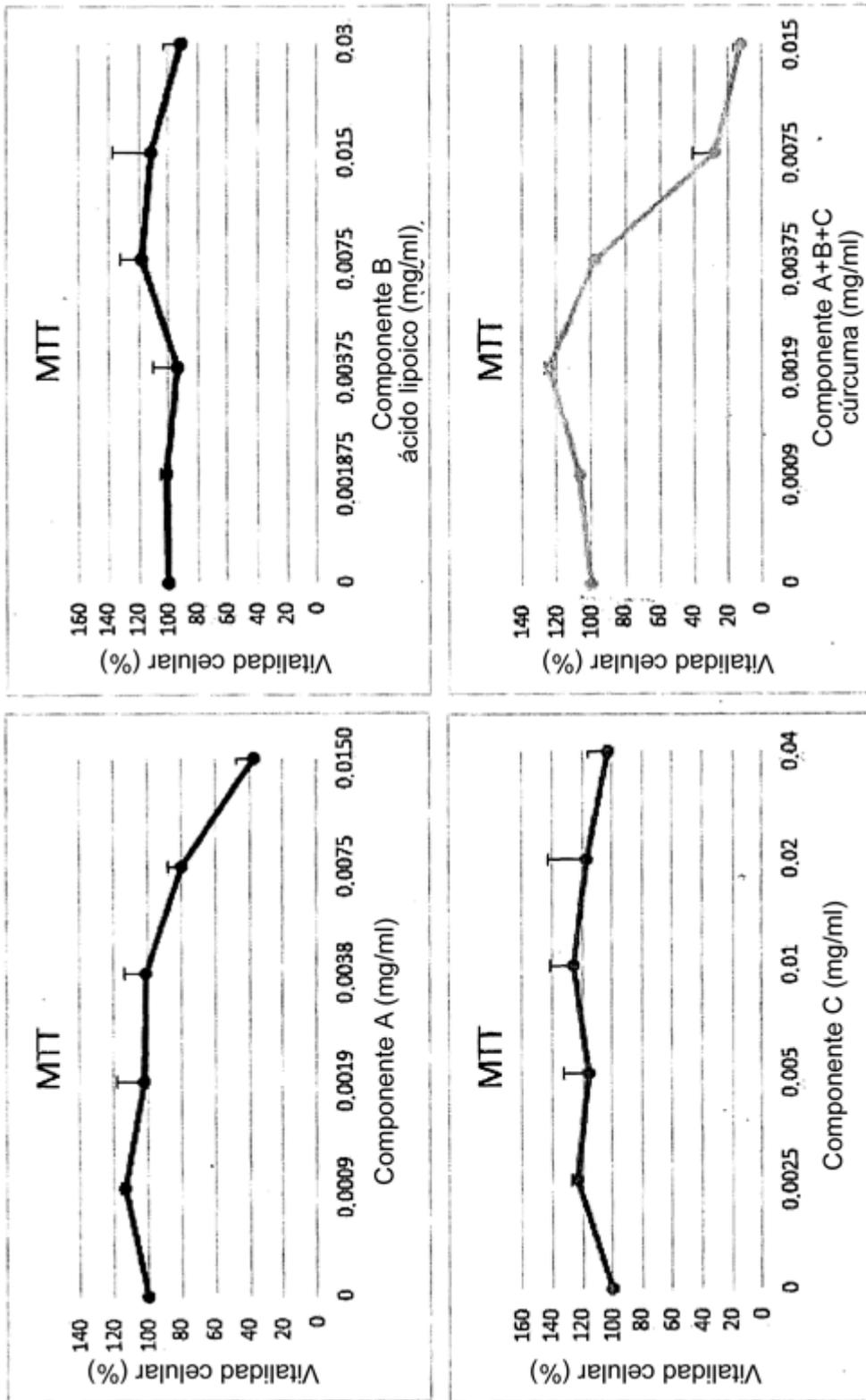


FIG.11

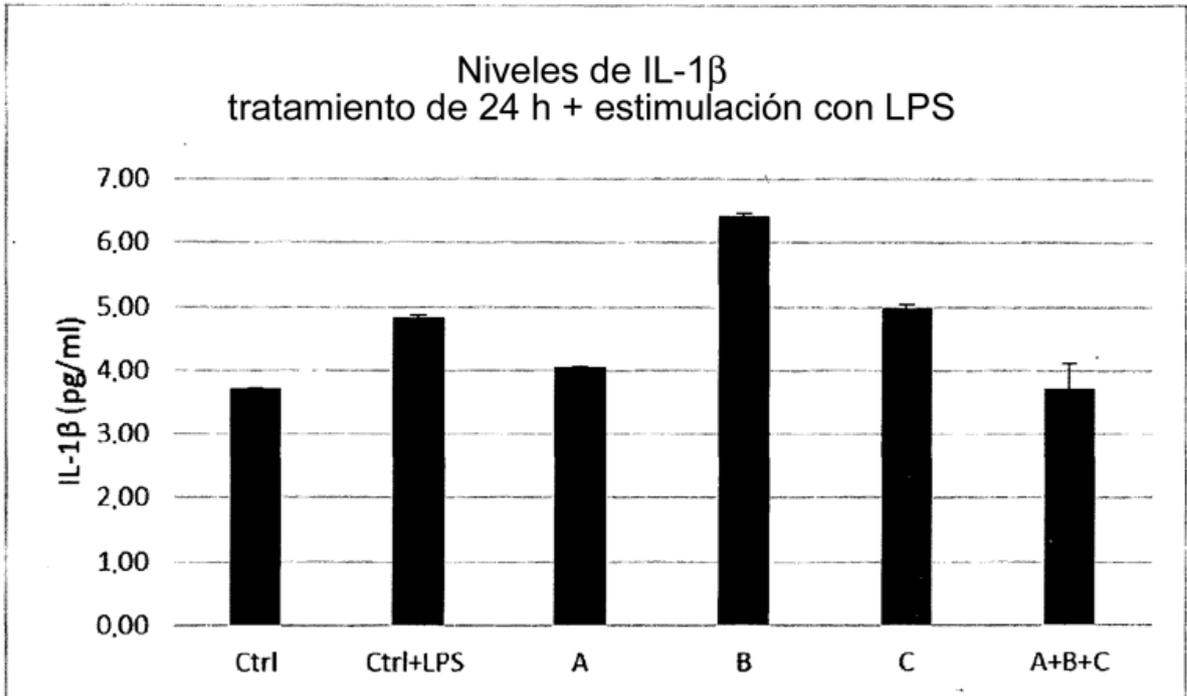


FIG.12

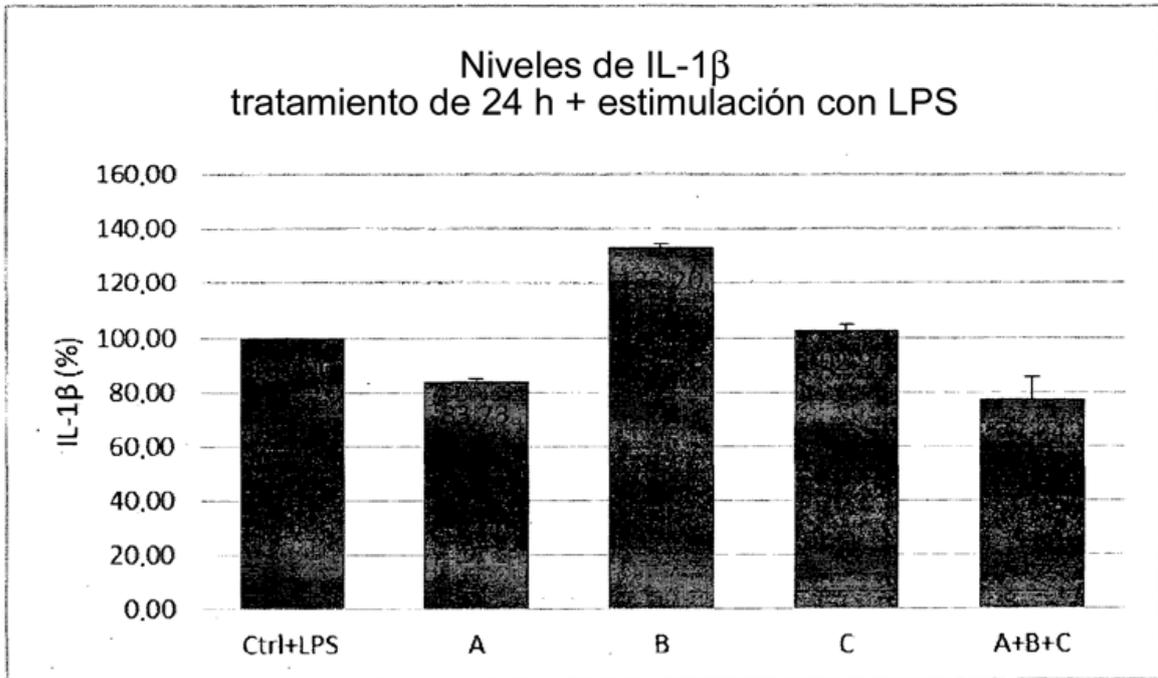


FIG.13

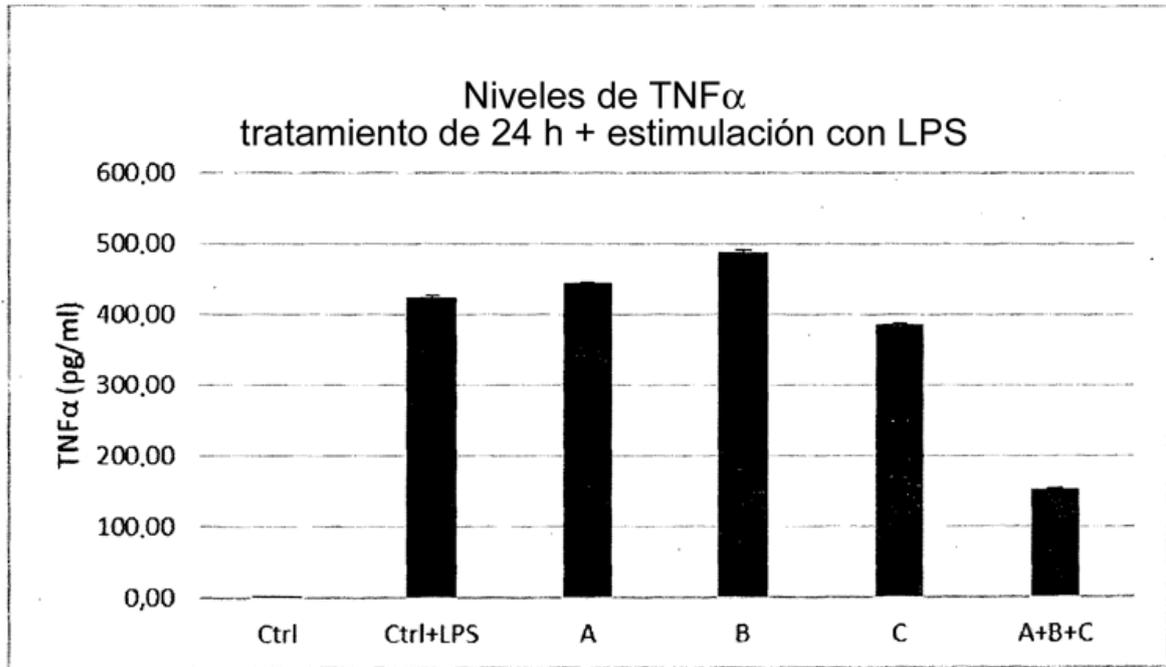


FIG.14

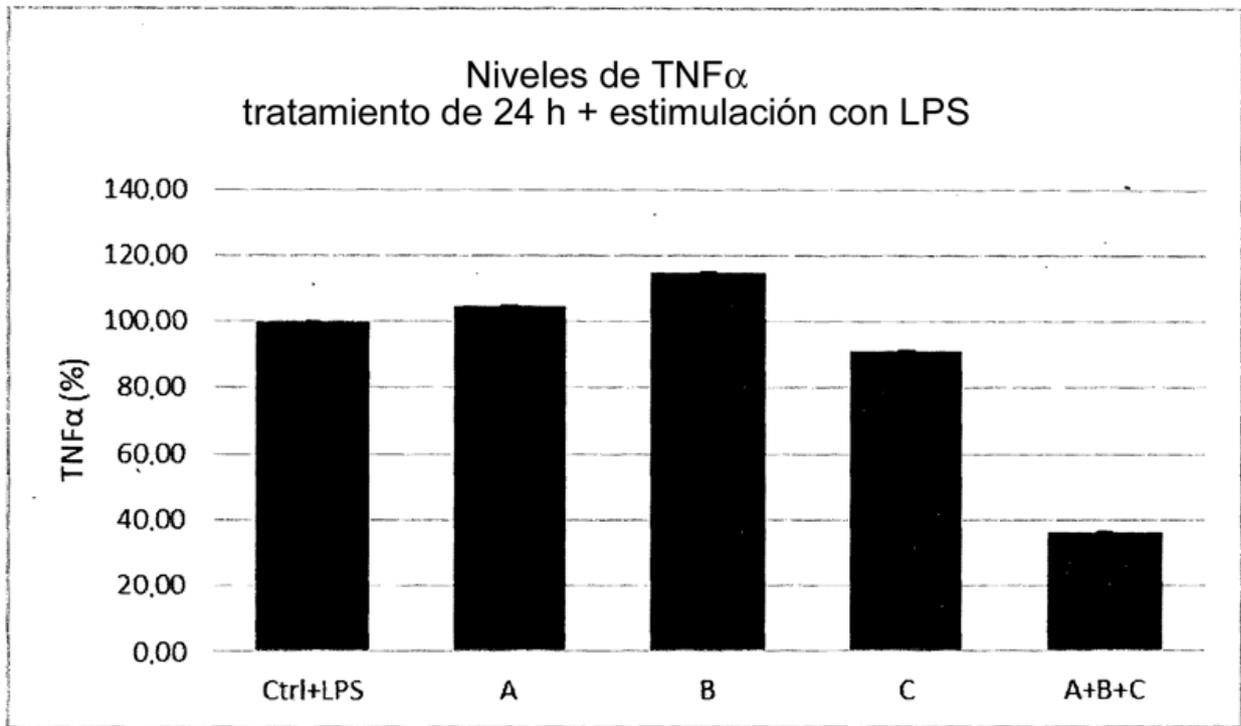


FIG.15