MD/EP 4225318 T2 2025.02.28

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenţia de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **MD/EP 4225318** (13) **T2**

(51) Int. Cl:***A61K 31/513*** (2006.01.01)
A61K 31/519 (2006.01.01)
A61P 25/28 (2006.01.01)
A61P 9/00 (2006.01.01)
A61K 45/06 (2006.01.01)
A61K 31/517 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENŢIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2023 0801

(22) Data de depozit: 2021.10.07

(96) Numărul cererii şi data de depozit a cererii de brevet european:21798288.3, 2021.10.07

(97) Numărul de publicare şi data publicării de către OEB a cererii de brevet european:4225318, 2023.08.16

(31) Numărul cererii prioritare: 20200644

(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2020.10.07

(33) Ţara cererii prioritare: EP

(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 02/2025, 2025.02.28

(80) Data publicării menţiunii acordării de către OEB: EPB nr. 46/2024, 2024.11.13

(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 09/2023, 2023.09.30

(71) Solicitant: WÖRWAG PHARMA GMBH & CO.KG, DE

(72) Inventatori: WÖRWAG Fritz, DE; WÖRWAG Marcus, DE

(73) Titular: WÖRWAG PHARMA GMBH & CO.KG, DE

(74) Mandatar autorizat: SOCOLOVA Sofia

(54) Biofactori pentru tratamentul şi profilaxia demenţei

(57) Rezumat:

Invenţia se referă la un produs pentru tratamentul şi profilaxia demenţei (tulburărilor) şi disfuncţiei mitocondriale, în special un medicament sau supliment alimentar, şi la utilizarea acestuia, produsul menţionat conţinând o combinaţie de biofactori care cuprind cel puţin orotat de magneziu şi acid folic sau folati.

Revendicări: 8

Figuri: 3

MD/EP 4225318 T2 2025.02.28

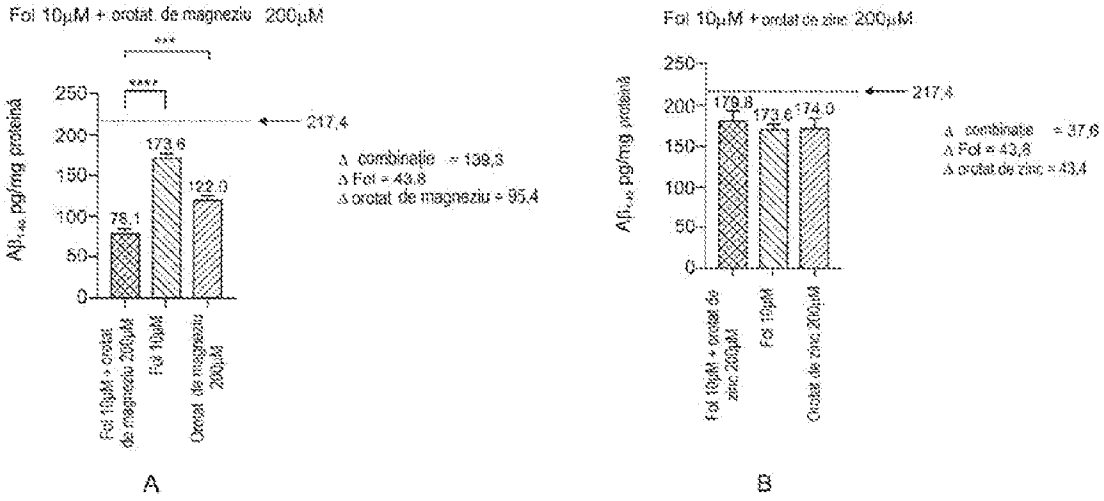

Fol 10µM + orotat de magneziu 200µM
***
****
217,4
173,6
122,0
78,1
Δ combinație = 139,3
Δ Fol = 43,8
Δ orotat de magneziu = 95,4
250
200
150
100
50
0
Fol 10µM + orotat de magneziu 200µM
Fol 10µM
Orotat de magneziu 200µM
A
Fol 10µM + orotat de zinc 200µM
217,4
179,8
173,6
174,0
Δ combinație = 37,6
Δ Fol = 43,8
Δ orotat de zinc = 43,4
Fol 10µM + orotat de zinc 200µM
Fol 10µM
Orotat de zinc 200µM
B

Fig. 1

Descriere:
(Descrierea se publică în varianta redactată de titular)

Invenţia se referă la o compoziţie pentru tratamentul şi profilaxia (bolilor) demenţei şi a disfuncţiei mitocondriale, în particular un supliment medicamentos sau alimentar, precum şi la utilizarea acesteia, care conţine o combinaţie de biofactori.

Demenţa este clasificată F00-F03 în ICD-10 (Clasificarea statistică internaţională a bolilor şi a problemelor de sănătate conexe, a 10-a revizuire (2019)) a Organizaţiei Mondiale a Sănătăţii (OMS) în capitolul V "Tulburări mentale şi comportamentale" şi este un sindrom care rezultă dintr-o boală de obicei cronică sau progresivă a creierului, cu tulburarea multor funcţii corticale superioare, inclusiv memoria, gândirea, orientarea, percepţia, calculul, capacitatea de învăţare, limbajul şi judecata. Conştiinţa nu este afectată. Deficienţele cognitive sunt de obicei însoţite de modificări ale controlului emoţional, comportamentului social sau motivaţiei. Acest sindrom apare în cazul bolii Alzheimer, al tulburărilor cerebrovasculare şi al altor condiţii care afectează creierul în mod primar (direct) sau secundar (indirect) (a se vedea şi "Dementia: A Public Health Priority" (2012) (https://www.alz.co.uk/WHO-dementia-report)).

Demenţa Alzheimer (AD) este cea mai frecventă formă de demenţă şi afectează peste 60% din persoanele cu demenţă din întreaga lume. Principala caracteristică patologică a demenţei Alzheimer AD este formarea plăcilor senile sau amiloide, constând din peptida Aß, şi a agregatelor neurofibrilare asociată cu degenerarea sinaptică şi neuronală şi cu glioza, caz în care microtubuli hiperfosforilaţi sunt asociaţi cu proteina tau (MAPT). Peptida Aß apare prin activităţile a cel puţin două proteaze diferite dintr-o proteină precursoare, "proteina precursoare a amiloidului" (APP), care este localizată în peretele celular al neuronilor. În timpul degradării proteolitice a APP şi prin modificarea ulterioară, se formează fragmente de Aß de diferite lungimi şi tipuri. Depunerea de Aß sub formă de plăci este considerată încă cel puţin un declanşator al simptomelor bolii. În demenţa vasculară, tulburările circulatorii din creier duc la moartea neuronilor. Acestea pot fi, de exemplu, rezultatul mai multor mici accidente vasculare cerebrale (de exemplu, din cauza ocluziei vasculare), care pot apărea şi în momente diferite (aşa-numita "demenţă multi-infarct").

Până acum, simptomele unei demenţe, cum ar fi AD, care apar ca urmare a morţii neuronilor şi determină gradul de demenţă, pot fi tratate doar simptomatic, dar nu cauzal.

În prezent, nu se cunosc medicamente autorizate, care să poată vindeca procesele patologice într-o demenţă (primară) cu o boală cauzală a creierului.

Evoluţia bolii sau chiar debutul demenţei poate fi totuşi întârziat sau influenţat pozitiv. Pe lângă reducerea riscului individual (de exemplu, evitarea excesului de greutate (obezitate), a lipsei de exerciţii fizice, a fumatului, a alcoolului, a stresului negativ etc.), biofactorii precum vitaminele etc. pot avea o contribuţie eficientă, caz în care ar trebui urmat un tratament sau o profilaxie continuă şi pe termen lung. Acesta este subiectul de cercetare al solicitantului.

AD este o boală multifactorială, la care rolul comorbidităţilor metabolice şi inflamatorii pare să devină din ce în ce mai important. Doar ~2 % din cazurile de AD sunt cauzate de mutaţii somatice ale proteinei precursoare a amiloidului (APP), presenilinei 1 (Psen 1) şi presenilinei 2 (Psen 2) (AD familială, fAD), în timp ce 98 % din cazurile de AD au o etiologie sporadică (AD sporadică, sAD), încă necunoscută, dar complexă şi multifactorială [1-3]. Studiile de asociere pe întreg genomul (GWAS) au asociat până în prezent alelele apolipoproteinei E, mai precis ApoE ε4, cu un risc crescut de a dezvolta atât tulburări cognitive uşoare, cât şi AD [4, 5]. Alţi factori genetici, care au fost recunoscuţi pe baza GWAS şi care au fost asociaţi cu apariţia sAD sunt reprezentaţi de, spre exemplu, apolipoproteina J (APOJ), proteina de asamblare a clatrinului legată de fosfatidilinositol (PICALM), receptorul de declanşare 2 exprimat de celule mieloide (TREM2), clusterul de diferenţiere 33 (CD33) şi receptorul de complement 1 (CR1) [4-7]. Recent, comorbidităţile metabolice ale AD cauzate de malnutriţie, în particular în ţările occidentale, au fost recunoscute ca jucând un rol tot mai important [8, 9]. Una dintre comorbidităţile sAD, care a fost identificată până acum, este diabetul (de tip I sau de tip II), o afecţiune patologică larg răspândită în rândul populaţiilor din lumea occidentală, estimându-se că 176 de milioane de persoane din întreaga lume sunt în prezent afectate de diabet de tip I (~5-10 % din cazuri), de tip II (~90 % din cazuri) sau de alte forme de diabet, de exemplu diabetul gestaţional [9, 10]. Diabetul de tip II, care reprezintă majoritatea cazurilor de diabet la nivel mondial, este mai frecvent la persoanele în vârstă şi este asociat cu o alimentaţie bogată în energie şi de slabă calitate în contextul unui stil de viaţă sedentar - circumstanţe care sunt frecvente în populaţiile din statele industrializate occidentale. Alimentaţia din aceste ţări include adesea alimente ieftine, puternic procesate, care conţin o proporţie considerabilă de grăsimi saturate, colesterol şi carbohidraţi simpli şi sunt lipsite de minerale esenţiale, oligoelemente şi vitamine [11-14]; de exemplu, populaţiile occidentale, în particular persoanele în vârstă, prezintă adesea deficienţe cronice în particular de magneziu, zinc şi vitamina B, în particular tiamină, acid folic, sau promedicamente precum benfotiamina şi vitamina

D, caz în care o deficienţă poate atinge toate stadiile, de la stadii asimptomatice - care pot fi determinate doar prin teste de laborator - până la stări clinic manifeste de deficienţe, cu sau fără simptome specifice. Este izbitor faptul că ~80 % dintre pacienţii cu AD dezvoltă intoleranţă la glucoză sau un diabet în cursul demenţei [15, 16], ceea ce indică o interacţiune reciprocă [17]. Aceasta este însoţită de disfuncţia mitocondrială, care poate fi o (co)cauză a demenţei.

În plus, dietele occidentale în combinaţie cu lipsa de activitate fizică duc adesea la obezitate [14] şi, în particular, o acumulare crescută de grăsime viscerală determină o metainflamare [18] (aşa-numita "inflamaţie la rece"), care duce la o eliberare a citokinelor proinflamatorii IL 1ß şi TNF-α din macrofagele şi hepatocitele infiltrate, având loc implicit o deteriorare a metabolismului sistemic [18, 19]. Atât obezitatea, cât şi diabetul exacerbează sau "alimentează" patologia AD [9, 11, 20].

Având în vedere faptul că, într-o populaţie în curs de îmbătrânire, tot mai mulţi pacienţi suferă de tulburări metabolice, inclusiv diabet şi obezitate (cauzate în principal de malnutriţie, singură sau în combinaţie cu lipsa de mişcare), care reprezintă un factor de risc major pentru dezvoltarea demenţei, în particular a bolii Alzheimer, o deficienţă sau un aport redus de biofactori, în particular magneziu, zinc şi vitamina B, în particular tiamină, acid folic sau promedicamente precum benfotiamina şi vitamina D, este deosebit de riscant pentru persoanele în vârstă. Acest lucru este însoţit de procese metabolice modificate la persoanele în vârstă (de exemplu, atrofie musculară etc.).

Biofactori pentru tratamentul şi profilaxia demenţei sunt descrişi în stadiul tehnicii. De exemplu, o deficienţă de vitamine, în particular o deficienţă de vitamina B12, poate deja provoca o demenţă (secundară) (WHO ICD10 (2019), F02.8).

După cum s-a explicat mai sus, solicitantul se concentrează în particular asupra următorilor compuşi sau substanţe, şi anume orotat de magneziu sau de zinc, vitamina D, în particular vitamina D3 (colecalcalciferol) şi vitamina B, în particular tiamină, acid folic, vitamina B6 şi B12 (cobalamină) şi benfotiamină.

În particular orotaţii se dovedesc a fi vehicule promiţătoare de Zn şi Mg, deoarece pot traversa cu uşurinţă bariera hematoencefalică. Orotaţii sunt de asemenea avantajoşi deoarece, de exemplu, atât orotatul de magneziu, cât şi orotatul de zinc pot fi uşor transportaţi/permeaţi prin membrana celulară şi sunt de asemenea preluaţi preferenţial de mitocondrii şi nucleul celular [21]. O stimulare rezultată a aprovizionării cu energie, de exemplu producţia de ATP în mitocondrii, este avantajoasă, deoarece demenţa, în particular AD, poate fi (co-)cauzată de disfuncţia mitocondrială (supra).

În stadiul tehnicii mai sunt descrise preparate combinate din biofactorii de mai sus pentru tratamentul şi profilaxia unei demenţe.

Astfel, US20150132273A1 descrie treonatul de magneziu în combinaţie cu biofactori pentru tratamentul tulburărilor cognitive. Cu toate acestea, treonatul se dovedeşte a fi un vehicul ineficient pentru magneziu sau zinc, deoarece treonatul în sine este degradat rapid în mai multe căi metabolice.

Utilizarea sărurilor de magneziu, dar nu a orotatului de magneziu, în combinaţie cu biofactori pentru tratamentul demenţei este descrisă în WO 2017/179644 A1.

WO 2017/059895 A1 dezvăluie în Exemplul 1 un preparat din L-5- metiltetrahidrofolat (100-800 µg echivalent acid folic) vitamina B3 (4-40 mg), vitamina B2 (0,4-5 mg), metilcobalamină (0,5-10 µg), vitamina B6 (0,4-5 mg), trimetilglicină (100-2000 mg), bisglicinat de zinc 5-50 mg) şi N-acetilcisteină (100-2000 mg) pentru tratamentul demenţei.

Mischoulon şi colab. [22] dezvăluie folatul pentru tratamentul demenţei, inclusiv al demenţei senile după Alzheimer şi pentru profilaxia acesteia. Este descrisă o administrare de 15 mg pe zi la pacienţi.

DE 20 2017 006840 U1 dezvăluie suplimente alimentare conţinând între 0,1 şi 3 g de orotat de zinc dihidrat şi între 1 şi 15 mg de acid folic, şi anume sub formă de tabletă efervescentă, băutură sau pulbere pentru tratamentul bolii Alzheimer, al demenţei sau al sindromului de oboseală, dar nu este dezvăluit orotatul de magneziu.

WO2010145644A2 dezvăluie compoziţii conţinând acid orotic cu o substanţă suport, de exemplu acid folic, pentru tratamentul demenţei, însă orotatul de magneziu nu este dezvăluit.

US6420342B1 descrie compoziţii alimentare conţinând acid folic şi orotat, de exemplu orotat de sodiu, pentru tratamentul bolilor cardiologice sau cardiovasculare, precum şi al bolii Alzheimer sau al oboselii cronice (fatigue), însă orotatul de magneziu nu este dezvăluit.

BUCK G, "NU NUMAI MAGNEZIUL, CI ŞI ACIDUL OROTIC AJUTĂ LA PROBLEMELE CARDIOLOGICE", ZFA. REVISTA PENTRU MEDICINĂ GENERALĂ, EDITURA HIPPOKRATE, STUTTGART, vol. 68, nr. 12, pagina 396, arată că nu numai magneziul, ci şi acidul orotic ajută la problemele cardiologice, cum ar fi insuficienţa cardiacă cronică, şi menţionează rezultate clinice pozitive cu orotat de magneziu în ceea ce priveşte aceste boli, dar nu şi demenţa.

Ma Fei şi colab. "Folic acid supplementation improves cognitive function by reducing the levels of peripheral inflammatory cytokines in elderly Chinese subjects with MCI", vol. 6, nr. 1, 37486,

SCIENTIFIC REPORTS, Nature (2016), dezvăluie că suplimentarea cu acid folic îmbunătățește funcția cognitivă, însă orotatul de magneziu nu este dezvăluit.

Cihâk Alois și colab. "Chapter 8 - Physiological Effects", Orotic Acid, prima ediție, MTP Press Limited, pagina 36, paragraful 3 (ISBN 978-94-009-8045-7), dezvăluie acid orotic pentru tratamentul hepatitei experimentale in vivo, însă orotatul de magneziu și acidul folic nu sunt dezvăluite.

Pornind de la acest stadiu al tehnicii, sarcina prezentei invenții este, prin urmare, furnizarea de combinații deosebit de adecvate și eficiente de biofactori pentru tratamentul și profilaxia unei demențe, în particular pentru terapia sau profilaxia pe termen lung.

În acest scop, solicitantul a efectuat studii extinse pe modele preclinice de AD, care arată caracterul adecvat al combinațiilor de biofactori pentru profilaxia și tratamentul demenței, în particular al AD.

Celulele neuroblastom imortalizate, și anume celulele umane SY-SY5Y-APP695, supraexprimă gena APP umană neuronală, astfel că are loc o formare intensificată de ß-amiloid.

Nematodul C. Elegans (CL2006) exprimă ß-amiloid uman (1-42) sub controlul unui promotor specific mușchilor, astfel că are loc o paralizie progresivă a viermelui. Durata de viață este redusă, iar viermele prezintă depozite caracteristice de ß-amiloid.

Șobolanii cu Alzheimer TgF344-AD au fost testați după 6-7 și 15-16 luni pentru activitatea de fosforilare oxidativă a mitocondriilor comparativ cu tipurile sălbatice.

Rezultatele sunt explicate și prezentate în Exemple și figuri.

În mod surprinzător, pentru o compoziție de orotat de magneziu și acid folic în celulele neuroblastom imortalizate, și anume celulele umane SY-SY5Y-APP695, s-a putut obține o inhibare supraadițivă a formării de ß-amiloid (Figura 1A).

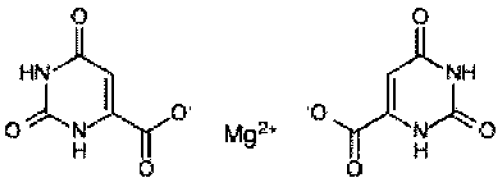
Acest rezultat se observă, de asemenea, în particular în caracterul adecvat al acestei combinații, pentru a normaliza producția de ATP în mitocondrii și pentru a contracara o disfuncție mitocondrială cauzală.

Prin urmare, invenția se referă la o compoziție, în particular un medicament sau un supliment alimentar sau o dietă echilibrată, cuprinzând sau constând din orotat de magneziu și acid folic pentru utilizarea în profilaxia și tratamentul demenței (denumită în continuare: compoziție conform invenției).

Studiile menționate anterior arată că, pe lângă orotat de magneziu și acid folic, un "cocktail" de orotat de magneziu sau de zinc, vitamina D, în particular vitamina D3 (colecalcalciferol) și vitamina B, în particular tiamină, acid folic, vitaminele B6 și B12 (cobalamină) și benfotiamină susțin efectul cel puțin în mod aditiv.

Prin urmare, sunt cuprinse conform invenției și alte combinații, caz în care cel puțin două sau trei sau patru sau cinci sau șase substanțe sau toate substanțele sunt selectate din grupul format din orotat de magneziu, orotat de zinc, vitamina D3, vitamina B6, acid folic, vitamina B12 și benfotiamină.

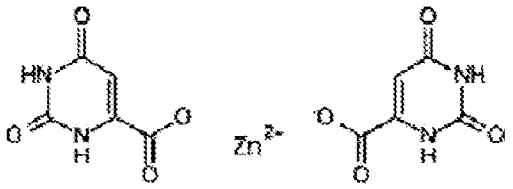
Orotatul de magneziu este o sare de acid orotic (sau 6-carboxiuracil) cu formula



Orotat de magneziu

și disponibil comercial, de exemplu Wörwag Pharma GmbH (Böblingen, Germania).

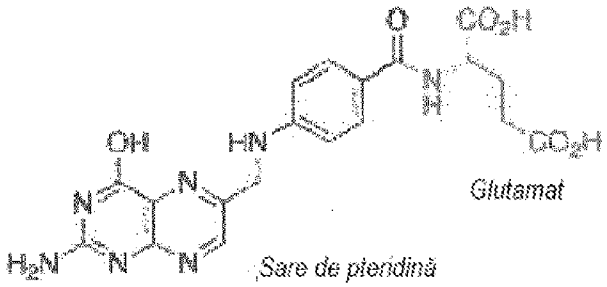
Orotatul de zinc este o sare de acid orotic (sau 6-carboxiuracil) cu formula



Orotat de zinc

și disponibil comercial, de exemplu Wörwag Pharma GmbH (Böblingen, Germania).

Acidul folic (sau acidul pteroil-mono-glutamic) este vitamina B9



sau tautomerii (2S)-2-[(4-[(2-amino-4-oxo-1H-pteridin-6-il)metilamino]benzoil) amino] acid pentandioic (Lactam) sau (2S)-N-(4-[([2-amino-4-hidroxi-pteridin-6-il]metil) amino]benzoil) acid glutamic (Lactim) și pot fi prezenți ca folați, caz în care sunt prezenți 2-7 radicali glutamil. În plus, folații pot fi hidrogenați la pteridină, cum ar fi 5, 6, 7, 8-tetrahidrofolatul sau substituiți (de exemplu, cu metil, cum ar fi 5-metiltetrahidrofolatul și altele). În conformitate cu invenția, astfel de folați (sau echivalenți de acid folic) sunt cuprinși de termenul acid folic. De asemenea, conform invenției, sunt cuprinși tautomerii și sărurile acidului folic. Acidul folic preparat sintetic este preferat conform invenției.

Benfotiamina este un promedicament lipofil al tiaminei (vitamina B1) și, prin urmare, reprezintă o provitamină și, de exemplu, este comercializată de solicitant sub denumirea de milgamma protekt® pentru tratamentul neuropatiilor și al tulburărilor cardiovasculare, care sunt cauzate de deficitul de vitamina B1.

Într-o altă formă preferată de realizare a compoziției conform invenției, raportul molar dintre orotatul de magneziu și acidul folic este de preferință 2-25:1, în particular 20:1.

Vitaminele B și D se referă la vitaminele disponibile în comerț D2 și D3 și B1 până la B12.

Substanțele menționate pot fi utilizate în formele lor fiziologic active, cuprind săruri, cofactori și hidrați sau stereoizomeri, tautomeri (de exemplu R, S, Z, E) etc.

În cadrul acestei invenții, prin demență (boală(boli)) se înțelege, în mod neexhaustiv, cea cum ar fi demența Alzheimer sau boala Alzheimer, demența în boala Alzheimer cu debut precoce (tip 2), demența în boala Alzheimer cu debut tardiv (tip 1), demența în boala Alzheimer cu formă atipică sau mixtă, demența vasculară, demența în boala cu corpi Lewy, toate aceste forme fiind conform invenției cuprinse. Aceste forme de demență sunt descrise în "Clasificarea statistică internațională a bolilor și a problemelor de sănătate conexe", a 10-a revizuire (2019) a Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) în capitolul V "Tulburări mentale și comportamentale" la F00-03 (supra).

Toate indicațiile menționate sunt descrise, de exemplu, în Pschyrembel, ediția a 267-a 2017, De Gruyter (Berlin).

Compoziția de activare conținând combinația de orotat de magneziu și acid folic conform invenției poate fi acum utilizată în mod avantajos pentru tratamentul și profilaxia unui pacient sau individ, animal, mamifer sau de preferință om bolnav, și anume pentru tratamentul și profilaxia (bolilor) demenței.

Compozițiile pot fi administrate în orice cantitate și doză.

Formularea galenică a compoziției conform invenției poate fi selectată din grupul constând din: picături, suc, sirop, tablete, drajeuri, capsule, formulări cu eliberare prelungită, perfuzii, unguente, emulsii, pulberi sau prafuri. Desigur, formularea poate conține excipienți farmaceutici convenționali.

Într-o altă formă de realizare, invenția se referă la un medicament conținând o compoziție conform invenției pentru utilizare sau aplicare pentru tratamentul și profilaxia demenței (bolilor).

O altă formă preferată de realizare se referă la un supliment alimentar conținând compoziția conform invenției, în particular sub formă unei compoziții dietetice sau unei diete echilibrate pentru tratamentul și

profilaxia (bolilor) demenței. Produsele nutriționale sau alimentele adecvate conform invenției, inclusiv apa, sunt de tipul celor care nu sunt definite concludent în Regulamentul (CE) nr. 178/2002 din 28 ianuarie 2002, cum ar fi produsele de panificație și băuturile și preparatele alimentare pentru sugari. Suplimentul alimentar conform invenției poate fi amestecat cu un suport compatibil fiziologic adecvat.

Preparatele farmaceutice conform invenției pot fi obținute sub formă de unități de dozare. Aceasta înseamnă că preparatele sunt sub formă de părți individuale, de preferință capsule și fiole, al căror conținut de ingredient activ corespunde unei fracțiuni sau unui multiplu al unei doze unice. Unitățile de dozare pot conține, de exemplu, 1, 2, 3 sau 4 doze unice sau 1/2, 1/3 sau 1/4 dintr-o doză unică. O doză unică conține, de preferință, cantitatea de compoziție conform invenției care este administrată într-o singură aplicare și care corespunde, de obicei, unei doze întregi, unei jumătăți, unei treimi sau unui sfert dintr-o doză zilnică. Se preferă o doză de trei ori pe zi, de preferință sub formă de tablete sau picături, în particular dimineața, la prânz și seara, eventual odată cu mesele.

Substanțele suport netoxice, inerte, acceptate din punct de vedere farmaceutic sunt diluanți solizi, semisolizi sau lichizi, materiale de umplutură și excipienți de formulare de orice fel, cum ar fi: a) umpluturi și diluanți, de exemplu a) amidon, lactoză, zahăr din trestie, glucoză, manitol, dextrine, maltodextrină și silice, dioxid de siliciu foarte dispersat, b) agenți de legare, de exemplu carboximetilceluloză, pulbere de celuloză, celuloză microcristalină, alginați, gelatină, polivinilpirolidonă, c) umectanți, de exemplu glicerol, d) dezintegranți, de exemplu agar-agar, carbonat de calciu și carbonat de sodiu, e) întârziatori de dizolvare, de exemplu parafină și f) acceleratori de resorbție, de exemplu compuși cuaternari de amoniu, g) agenți de umezire, de exemplu alcool cetilic, glicerol alcool cetilic, monostearat de glicerol, h) adsorbanți, de exemplu caolin și bentonită și i) lubrifianți, de exemplu talc, stearat de calciu și de magneziu și polietilenglicoli solizi sau amestecuri ale materiilor enumerate la literele a) la i).

Tabletele, drajeurile, capsulele, pastilele și granulele pot fi prevăzute cu acoperiri și învelișuri uzuale, conținând opțional agenți opacifianți, cum ar fi, în mod neexhaustiv, de exemplu hipromeloză, celuloză microcristalină, acid stearic, dioxid de titan, și pot fi compuse, de asemenea, astfel încât să elibereze ingredientul (ingredientele) activ(e) numai sau de preferință într-o anumită parte a tractului intestinal, dacă este necesar cu întârziere, caz în care, ca mase de încorporare, pot fi utilizate, de exemplu, substanțe polimerice și ceară.

Prin urmare, invenția se referă, de asemenea, la un preparat farmaceutic conținând o compoziție conform invenției împreună cu excipienți și aditivi.

Exemple și figuri:

Următoarele Exemple și figuri servesc exclusiv la explicarea invenției, fără a limita invenția la aceste Exemple.

Exemplul 1:
Model celular:
Cultivare celulară:

Celulele SH-SY5Y neuroblastom umane utilizate au fost transfectate stabil cu ADN din APP695 (APP) de tip sălbatic uman (Grewal R, Reutzel M, Dilberger B și colab. (2020) Purified oleocanthal and ligstroside protect against mitochondrial dysfunction in models of early Alzheimer's disease and brain ageing. Exp Neurol 328: 113248, Stockburger C, Gold VAM, Pallas T și colab. (2014) A cell model for the initial phase of sporadic Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis 42: 395-411).

Celulele SH-SY5Y-APP au fost cultivate la 37 °C sub o atmosferă de 5% CO2 în mediu de cultură (DMEM), suplimentat cu 10% (v/v) ser fetal inactivat termic de viței, 60 µg/ml streptomicină, 60 unități/ml penicilină, 0,3 mg/ml higromicină, aminoacizi MEM neesențiali și 1 mM piruvat de sodiu 1%. Celulele au fost transferate la fiecare 3 zile și utilizate atunci când au atins confluența de 70 - 80%.

Celulele au fost incubate cu 200µM orotat de magneziu, 10µM acid folic și combinația lor timp de 24 de ore. O incubare cu DMEM a servit drept martor.

Măsurare Aß 1-40:

După 24 h de incubare, mediul a fost colectat în sticlele cu mediu de cultură celulară, iar celulele au fost clătite cu PBS rece. Suspensia a fost apoi centrifugată timp de 5 minute la 220 g. După care, supernatantul a fost apoi eliminat, iar granulele celulare au fost resuspendate în 1,5 ml PBS și inhibitor de protează. Soluția a fost apoi centrifugată timp de 5 minute la 112 g, iar supernatantul a fost îndepărtat. Granulele celulare au fost colectate și s-au adăugat 600 µL de tampon de extracție celulară (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, SUA) și incubate timp de 30 de minute. Suspensia a fost apoi centrifugată timp de 10 minute la 13, 000 g. Supernatantul a fost transferat într-un tub nou și depozitat la -80 °C. Supernatanții au fost dezghețați pe gheață și pipetați într-o placă de 384 godeuri (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). S-a utilizat un kit 1-40 HTRF Amyloid Beta (Cisbio, Codolet, Franța) pentru a detecta concentrația de beta amiloid. Probele au fost utilizate în conformitate cu instrucțiunile producătorului. Densitatea optică a fost după aceea măsurată la 665 și 622 nm. Valorile beta amiloid au fost apoi normalizate la conținutul de proteine.

Cuantificarea proteinelor:

Conținutul de proteine a fost determinat cu ajutorul kitului PierceTM Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SUA). Instrucțiunile au fost urmate conform producătorului. Albuminul seric bovin a fost utilizat ca standard. Protocolul se bazează pe o publicație a lui Smith și colab. (Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT și colab. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry 150 : 76-85).

Nematod (Caenorhabditis elegans)
C. elegans și tulpini bacteriene

Tulpina de tip sălbatic C. elegans N2 a fost obținută de la Caenorhabditis elegans Genetics Center (Universitatea din Minnesota, MN, SUA). Nematozii au fost menținuți pe plăci de agar cu mediu de creștere a nematozilor (NGM), care au fost cultivate cu E. coli OP50 la 20 °C în conformitate cu protocoalele standard (Brenner S (1974) The genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics 77: 71-94). Pentru toate experimentele, populațiile sincrone au fost generate utilizând un protocol standard de albire (Theresa Stiernagle (2006) Maintenance of C. elegans. WormBook: 1-11).

Cultivare și tratament:

Larvele sincrone au fost spălate de două ori în tampon M9, numărate și ajustate la 10 larve per 10 pL. Nematozii au fost pipetați în plăci de 96 godeuri (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germania). Concentrația de OP50 a fost ajustată la 1 la densitatea optică OD600 cu nematozi lichizi. OP50-NGM a fost adăugat ca sursă de hrană standardizată folosind de 4,4 ori volumul de larve cu soluție M9. Larvele L1 au fost păstrate la 20 °C cu agitare constantă și au ajuns la vârsta de adult în 3 zile. Efectorii au fost adăugați după atingerea vârstei de adult tânăr, cu 48 h înainte de experiment. Ca efectori, s-au aplicat 100µM orotat de magneziu și 50µM acid folic dizolvate în M9. Tamponul M9 a fost aplicat ca martor.

Rezistență la stres termic:

Aproximativ 10 nematozi per godeu au fost cultivați într-o microplacă de 96 godeuri, așa cum s-a menționat mai sus. După 48 de ore de incubare, efectorii au fost aplicați conform descrierii anterioare. Timpul până la moartea nematozilor a fost determinat utilizând un test de toleranță termică pe microplacă, astfel cum este descris de Fitzenberger și colab. (Fitzenberger E, Deusing DJ, Marx C și colab. (2014) The polyphenol quercetin protects the mev-1 mutant of Caenorhabditis elegans from glucose-induced reduction of survival under heat-stress depending on SIR-2.1, DAF-12, and proteasomal activity. Molecular nutrition & food research 58: 984-994).

Nematozii au fost spălați din adâncituri cu tampon M9 în tuburi de 15 ml, urmat de trei etape suplimentare de spălare. În fiecare adâncitură a unei plăci de microtitrare negre de 384 godeuri (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germania), s-au adăugat 6,5 µL tampon M9/Tween® 20 soluție (1% v/v). Ulterior, 1 pL tampon M9 conținând un nematod a fost pipetat în fiecare godeu sub un stereomicroscop (Breukhoven Microscope Systems, Capelle aan den Ijssel, Țările de Jos) și amestecat cu 7,5 µL SYTOXTM green (concentrație finală 1 M; Life Technologies, Karlsruhe, Germania). Pentru a preveni evaporarea apei, plăcile au fost acoperite cu o folie de sigilare Rotilab (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germania). A fost indus un șoc termic (37 °C) și fluorescența a fost măsurată cu un cititor de plăci ClarioStar (BMG, Ortenberg, Germania) la fiecare 30 de minute pe o perioadă de 17 h. Pentru a detecta fluorescența verde a SYTOXTM, lungimea de undă de excitație a fost setată la 485 nm, iar emisia a fost detectată la 538 nm.

Exemplul 2:

Fosforilarea oxidativă (OxPhosC) a mitocondriilor izolate din hipocampul șobolanilor transgenici F344-AD după tratament

După decapitarea șobolanilor F344-AD, hipocampul este izolat și omogenizat la 4 °C. După etapele de centrifugare, mitocondriile izolate sunt plasate în camera unui respirometru. Prin adăugarea succesivă de substraturi și inhibitori ai lanțului respirator, influența asupra consumului de oxigen în cameră poate fi măsurată la un electrod de platină și activitatea complecșilor individuali poate fi examinată în mod izolat (preparat de Tina M. Schwarzkopf, Konrad A. Koch, Jochen Klein, Neurodegeneration after transient brain ischemia in aged mice: Beneficial effects of bilobalide, Brain Research, vol. 1529, 5 septembrie 2013, pagini 178-187 cu alte referințe).

Legendă	Tratament	Dozare
A, E (martor)	Fără aditivi	0
B	Orotat de magneziu	500 mg/kg
C	Benfotiamină	300 mg/kg
D, F (cocktail)	Orotat de magneziu Benfotiamină Vitamina B12 Acid folic Vitamina D3	500 mg/kg 300 mg/kg mg/kg 10 mg/kg 3000 I.U./kg

Rezultatele sunt prezentate în Figura 3.

Figura 1 prezintă cantitatea de peptidă beta-amiloid (Aß1-40) în pg/mg proteină în SH-SY5Y-APP695 după 24 h de incubare cu substanțele active A.) acid folic (Fol; 10 µM) și orotat de magneziu (200 µM) și combinația lor și B.) acid folic (Fol; 10 µM) și orotat de zinc (200 µM) și combinația lor. Sunt prezentate valorile medii respective din 6 teste independente (n=6) și erorile standard corespunzătoare (± SEM). Semnificațiile (***p < 0,001 sau ****p < 0,0001) au fost determinate utilizând ANOVA one-way. Linia punctată indică valoarea medie a martorului (217,4 pg/mg Aß).

Din Figura 1A rezultă un efect sinergic pentru acid folic și orotat de magneziu, deoarece:

Δ Combinație > Δ Orotat de magneziu + Δ Fol.

Figura 2 prezintă durata de viață a C. elegans în testul de stres termic după tratamentul cu orotat de magneziu și acid folic ("Fol") și combinația acestora sub formă de curbe Kaplan-Meier. Viermii netratați au servit drept martori (M9 [control]). Sunt prezentate valorile medii respective și erorile standard corespunzătoare (± SEM). Semnificația (**p < 0,01) a fost calculată utilizând testul log-rank (Mantel-Cox).

Figura 3 prezintă capacitatea (UI = µmol/min) de fosforilare oxidativă (OxPhosC) a mitocondriilor izolate din hipocampul șobolanilor transgenici F344-AD. Cele patru tratamente (B, C, D, F) și cele două grupe de vârstă (6-7 luni, 15-16 luni) sunt reprezentate pe abscisă. Nu există diferențe semnificative în OxPhosC între animalele în vârstă de 6-7 luni ca urmare a tratamentelor, deși tratamentul cu cocktail (grupa D) determină o creștere a OxPhosC. Din cauza vârstei, OxPhosC scade semnificativ din punct de vedere statistic (a se compara grupa A cu grupa E). Acest efect al vârstei poate fi influențat semnificativ din punct de vedere statistic sau anulat de tratamentul cu cocktail (a se compara grupa E cu grupa F).

Bibliografie

1. Hardy J. A hundred years of Alzheimer's disease research. Neuron. 2006; 52(1):3-13.

2. Selkoe DJ and Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO Mol Med. 2016; 8(6):595-608.

3. Querfurth HW and LaFerla FM. Alzheimer's disease. N Engl J Med. 2010; 362(4):329-344.

4. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. Nat Genet. 2009; 41 (10) : 1088-1093.

5. Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, DeStafano AL, Bis JC, Beecham GW, Grenier-Boley B, Russo G, Thorton-Wells TA, Jones N, Smith AV, Chouraki V, Thomas C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. Nat Genet. 2013; 45(12) : 1452-1458.

6. Genin E, Hannequin D, Wallon D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Bullido MJ, Engelborghs S, De Deyn P, Berr C, Pasquier F, Dubois B, Tognoni G, Fievet N, Brouwers N, Bettens K,

et al. APOE and Alzheimer disease: a major gene with semidominant inheritance. Mol Psychiatry. 2011; 16(9):903-907.

7. Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang LS, Vardarajan BN, Buros J, Gallins PJ, Buxbaum JD, Jarvik GP, Crane PK, Larson EB, Bird TD, Boeve BF, Graff-Radford NR, De Jager PL, Evans D, et al. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. Nat Genet. 2011; 43(5):436-441.

8. Daulatzai MA. Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: Key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease. J Neurosci Res. 2017; 95(4):943-972.

9. Baglietto-Vargas D, Shi J, Yaeger DM, Ager R and LaFerla FM. Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk. Neurosci Biobehav Rev. 2016; 64:272-287.

10. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R and King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care. 2004; 27(5):1047-1053.

11. Abate G, Marziano M, Rungratanawanich W, Memo M and Uberti D. Nutrition and AGE-ing: Focusing on Alzheimer's Disease. Oxid Med Cell Longev. 2017; 2017:7039816.

12. Qizilbash N, Gregson J, Johnson ME, Pearce N, Douglas I, Wing K, Evans SJ and Pocock SJ. BMI and risk of dementia in two million people over two decades: a retrospective cohort study. Lancet Diabetes Endocrinol. 2015; 3(6):431-436.

13. Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, O'Keefe JH and Brand-Miller J. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. Am J Clin Nutr. 2005; 81(2):341-354.

14. Nishida C, Uauy R, Kumanyika S and Shetty P. The joint WHO/FAO expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. Public Health Nutr. 2004; 7(1A):245-250.

15. Janson J, Laedtke T, Parisi JE, O'Brien P, Petersen RC and Butler PC. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. Diabetes. 2004; 53(2):474-481.

16. Kroner Z. The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? Altern Med Rev. 2009; 14(4):373-379.

17. Clarke JR, Lyra ESNM, Figueiredo CP, Frozza RL, Ledo JH, Beckman D, Katashima CK, Razolli D, Carvalho BM, Frazao R, Silveira MA, Ribeiro FC, Bomfim TR, Neves FS, Klein WL, Medeiros R, et al. Alzheimer-associated Abeta oligomers impact the central nervous system to induce peripheral metabolic deregulation. EMBO Mol Med. 2015; 7(2):190-210.

18. Jais A, Einwallner E, Sharif O, Gossens K, Lu TT, Soyal SM, Medgyesi D, Neureiter D, Paier-Pourani J, Dalgaard K, Duvigneau JC, Lindroos-Christensen J, Zapf TC, Amann S, Saluzzo S, Jantscher F, et al. Heme oxygenase-1 drives metaflammation and insulin resistance in mouse and man. Cell. 2014; 158(1):25-40.

19. Calay ES and Hotamisligil GS. Turning off the inflammatory, but not the metabolic, flames. Nat Med. 2013; 19(3):265-267.

20. Graham LC, Harder JM, Soto I, de Vries WN, John SW and Howell GR. Chronic consumption of a western diet induces robust glial activation in aging mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. Sci Rep. 2016; 6:21568.

21. Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero F2. Oral magnesium supplementation improves the metabolic profile of metabolically obese, normal-weight individuals: a randomized double-blind placebo-controlled trial. Arch Med Res. 2014 Jul;45(5):388-93. doi: 10.1016/j.arcmed.2014.05.003. Epub 2014 May 11

22. MISCHOULON DAVID ET AL: "The role of folate in depression and dementia.",THE JOURNAL OF CLINICAL PSYCHIATRY 2007, Bd. 68 Suppl 10, 2007, pagini 28-33

23. Wenzhang Wang, Fanpeng Zhao, Xiaopin Ma, George Perry, Xiongwei Zhu, Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances, Molecular Neurodegeneration (2020) 15:30

24. Simon M. Bell, Katy Barnes, Matteo De Marco, Pamela J. Shaw, Laura Ferraiuolo, Daniel J. Blackburn, Annalena Venneri, Heather Mortiboys, Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease: A Biomarker of the Future? Biomedicines 2021, 9, 63 25. Catrin Herpicha, Kristina Franz, Ursula Muller-Werdan, Mario Ost, Kristina Norman, Age-related fatigue is associated with reduced mitochondrial function in peripheral blood mononuclear cells, Exp. Gerontology 2021, Vol. 144

(56) Referinţe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A2-2010/145644
- BUCK G: "NICHT NUR MAGNESIUM, AUCH OROTSAEURE HILFT BEI KARIOLOGISCHEN PROBLEMEN", ZFA. ZEITSCHRIFT FUER ALLGEMEINMEDIZIN, HIPPOKRATES VERLAG, STUTTGART, DE, vol. 68, no. 12, 30 April 1992 (1992-04-30), pages 396, XP000609779, ISSN: 0341-9835
- MA FEI ET AL: "Folic acid supplementation improves cognitive function by reducing the levels of peripheral inflammatory cytokines in elderly Chinese subjects with MCI", vol. 6, no. 1, 23 November 2016 (2016-11-23), XP055787301, Retrieved from the Internet <URL:http://www.nature.com/articles/srep37486> DOI: 10.1038/srep37486
- DE-U1- 202017 006 840
- "Orotic Acid, 1st edition", 1 January 1980, MTP PRESS LIMITED, ISBN: 978-94-009-8045-7, article CIHÁK ALOIS ET AL: "Chapter 8 - Physiological Effects", pages: 36 - 36, XP055787619, DOI: 10.1007/ 978-94-009-8043-3
- US-B1- 6 420 342

(57) Revendicări:

1. Compoziţie cuprinzând orotat de magneziu şi acid folic sau folaţi sau tautomeri şi săruri ale acestora pentru utilizare în profilaxia şi tratamentul demenţei.

2. Compoziţie pentru utilizare în profilaxia şi tratamentul unei demenţe conform revendicării 1 selectate dintre demenţa Alzheimer sau boala Alzheimer, demenţa în boala Alzheimer cu debut precoce (tip 2), demenţa în boala Alzheimer cu debut tardiv (tip 1), demenţa în boala Alzheimer cu formă atipică sau mixtă, demenţa vasculară, demenţa în boala cu corpi Lewy.

3. Compoziţie pentru utilizare în profilaxia şi tratamentul unei demenţe conform uneia dintre revendicările 1 sau 2, în care raportul molar dintre orotatul de magneziu şi acidul folic este de 2-25:1, în particular 20:1.

4. Compoziţie pentru utilizare în profilaxia şi tratamentul unei demenţe conform uneia dintre revendicările 1 la 3, în care compoziţia conţine în plus cel puţin una sau mai multe substanţe selectate din grupul format din orotat de zinc, benfotiamină, vitamina D şi vitamina B.

5. Compoziţie pentru utilizare în profilaxia şi tratamentul unei demenţe conform uneia dintre revendicările 1 la 4, în care compoziţia conţine în plus cel puţin una sau mai multe substanţe selectate din grupul format din orotat de zinc, vitamina D3, tiamină, vitamina B6, vitamina B12 şi benfotiamină.

6. Compoziţie pentru utilizare în profilaxia şi tratamentul unei demenţe conform uneia dintre revendicările precedente, în care compoziţia este un medicament sau un supliment alimentar sau o dietă echilibrată.

7. Preparate farmaceutice conţinând o compoziţie pentru utilizare în profilaxia şi tratamentul unei demenţe conform uneia dintre revendicările 1 la 6, opţional împreună cu substanţe suport adecvate, în particular sub formă de picături, suc, sirop, tablete, drajeuri, capsule, formulări cu eliberare prelungită, infuzii, unguente, emulsii, pulberi, prafuri.

8. Preparate farmaceutice conţinând o compoziţie pentru utilizare în profilaxia şi tratamentul unei demenţe conform uneia dintre revendicările 1 la 7, împreună cu excipienţi şi aditivi.

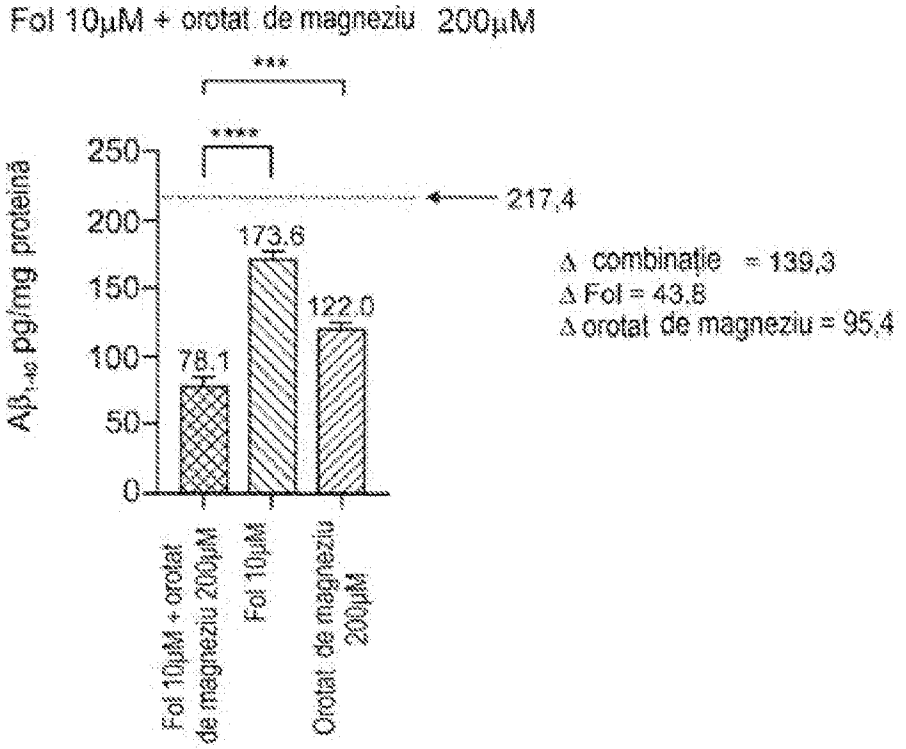

Fol 10µM + orotat de magneziu 200µM
***
****
250
200
150
100
50
0
217,4
173,6
122,0
78,1
Aβ1-42 pg/mg proteină
Δ combinație = 139,3
Δ Fol = 43,8
Δ orotat de magneziu = 95,4
Fol 10µM + orotat de magneziu 200µM
Fol 10µM
Orotat de magneziu 200µM

Fig. 1A

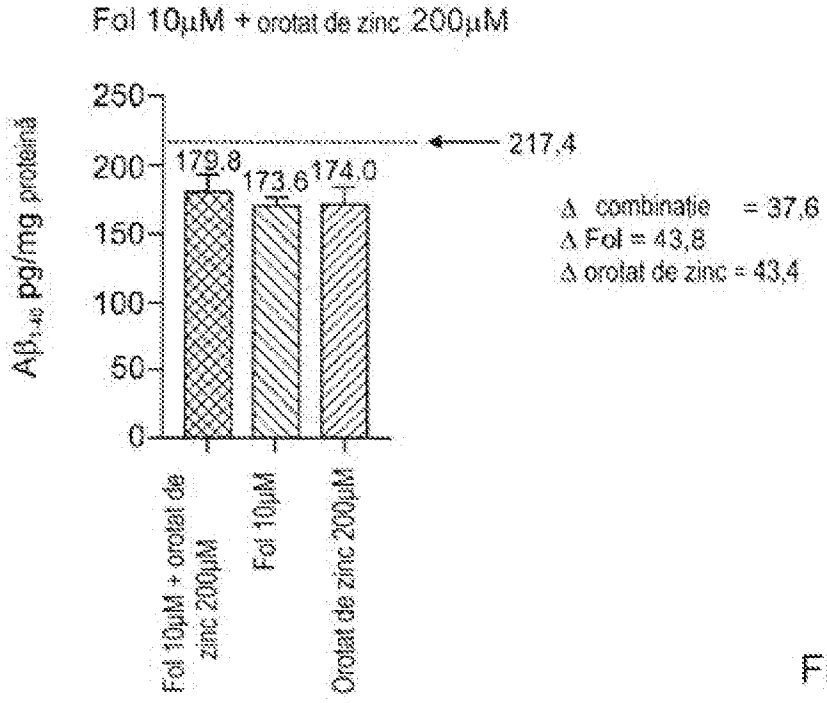

Fol 10µM + orotat de zinc 200µM
250
200
150
100
50
0
217,4
179,8
173,6
174,0
Aβ1-42 pg/mg proteină
Δ combinație = 37,6
Δ Fol = 43,8
Δ orotat de zinc = 43,4
Fol 10µM + orotat de zinc 200µM
Fol 10µM
Orotat de zinc 200µM

Fig. 1B

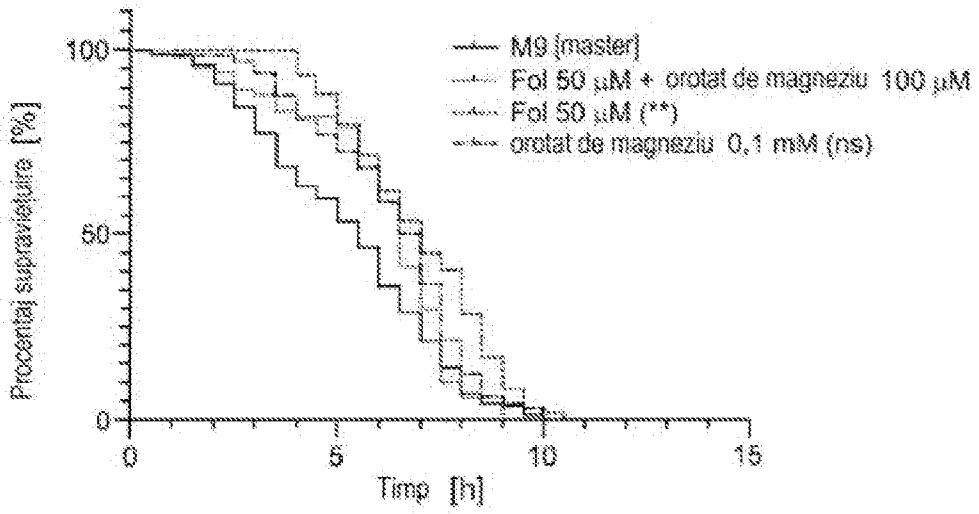

M9 (master)
Fol 50 µM + orotat de magneziu 100 µM
Fol 50 µM (**)
orotat de magneziu 0,1 mM (ns)
Procentaj supravietuire [%]
100
50
0
0
5
10
15
Timp [h]

Fig. 2

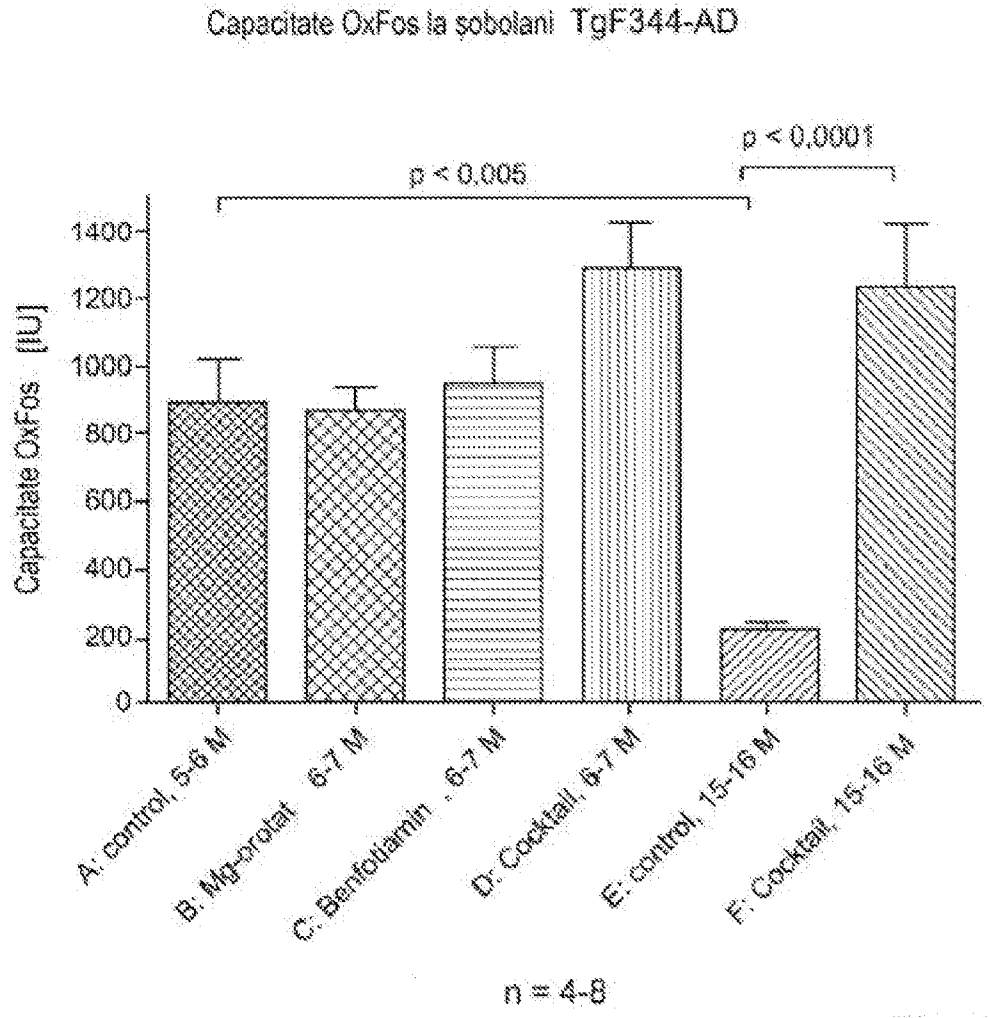

Capacitate OxFos la șobolani TgF344-AD
p < 0,0001
p < 0,005
Capacitate OxFos [IU]
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
A: control, 5-6 M
B: Mg-orotat 6-7 M
C: Benfotiamin 6-7 M
D: Cocktail, 6-7 M
E: control, 15-16 M
F: Cocktail, 15-16 M
n = 4-8

Fig. 3