

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 010 450**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/513** (2006.01)

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 31/517** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2021 PCT/EP2021/077684**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2022 WO22074114**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2021 E 21798288 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024 EP 4225318**

54 Título: **Biofactores para el tratamiento y la profilaxis de demencia**

30 Prioridad:

**07.10.2020 EP 20200644**

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

**03.04.2025**

73 Titular/es:

**WÖRWAG PHARMA GMBH & CO.KG (100.00%)  
Flugfeld-Allee 24  
71034 Böblingen, DE**

72 Inventor/es:

**WÖRWAG, FRITZ y  
WÖRWAG, MARCUS**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 3 010 450 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**

Biofactores para el tratamiento y la profilaxis de demencia

La invención se refiere a un agente para el tratamiento y la profilaxis de la demencia (enfermedades), en particular, un suplemento medicinal o nutricional y su uso, que contiene una combinación de biofactores.

5 La demencia está clasificada en la CIE-10 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud, 10ª Revisión (2019)) en el capítulo V "Trastornos mentales y del comportamiento", F00-F03 y es un síndrome resultante de una enfermedad que por lo general es crónica o progresiva del cerebro con alteración de muchos de las siguientes funciones corticales superiores, como la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, el aprendizaje, el lenguaje y el juicio. La conciencia no se nubla. Las alteraciones cognitivas suelen ir acompañadas de cambios en el control emocional, el comportamiento social o la motivación. Este síndrome se presenta en la enfermedad de Alzheimer, los trastornos cerebrovasculares y otras afecciones que afectan principal (directamente) o secundariamente (indirectamente) al cerebro (véase también "Demencia: una prioridad de salud pública" (2012) (<https://www.alz.co.uk/WHO-dementia-report>)).

15 La demencia de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia y actualmente afecta a más del 60 % de las personas con demencia en todo el mundo. La principal característica patológica de la EA es la formación de placas seniles o amiloides, compuestas por el péptido Aβ, y agregados neurofibrilares acompañados de degeneración sináptica y neuronal y gliosis, con microtúbulos hiperfosforilados asociados a la proteína tau (MAPT). El péptido Aβ se forma por las actividades de al menos dos proteasas diferentes a partir de una proteína precursora, la "proteína precursora amiloide" (APP), que se localiza en la pared celular de las neuronas. Durante la degradación proteolítica del APP y a través de la modificación posterior, se forman fragmentos de Aβ de diferente longitud y tipo. El depósito de Aβ en forma de placas sigue considerándose al menos un factor desencadenante de los síntomas de la enfermedad. En la demencia vascular, los trastornos circulatorios del cerebro provocan la muerte de las neuronas. Puede ser, por ejemplo, la consecuencia de varios pequeños accidentes cerebrovasculares (por ejemplo, como resultado de una oclusión vascular), que también pueden ocurrir en diferentes momentos (la llamada "demencia multiinfarto").

Hasta ahora, sólo se pueden tratar en forma sintomática los síntomas de la demencia, como la EA, que se producen como consecuencia de la muerte de las neuronas y determinan el grado de demencia, pero no causalmente.

30 No se conoce ningún fármaco aprobado hasta la fecha que pueda curar los procesos de la enfermedad en la demencia (primaria) con una enfermedad causal del cerebro. Sin embargo, se puede retrasar el curso de la enfermedad o incluso la aparición de la demencia o influir positivamente en ella. Además de reducir el riesgo individual (por ejemplo, evitar el sobrepeso (obesidad), la falta de ejercicio, el tabaquismo, el alcohol, el estrés negativo, etc.), los biofactores, como las vitaminas, etc., pueden contribuir eficazmente, por lo que se debe seguir un tratamiento o profilaxis a largo plazo y continuo. Este es el objeto de la investigación del solicitante.

35 La EA es una enfermedad multifactorial en la que el papel de las comorbilidades metabólicas e inflamatorias parece ser cada vez más importante. En este contexto, sólo el ~2 % de los casos de EA están causados por mutaciones somáticas en la proteína precursora del amiloide (APP), la presenilina 1 (Psen 1) y la presenilina 2 (Psen 2) (EA familiar, fAD), mientras que el 98 % de los casos de EA tienen una etiología esporádica (EA esporádica, sAD), aún desconocida, pero compleja y multifactorial [1-3]. Los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) han vinculado previamente los alelos de la apolipoproteína E, más concretamente la ApoE e4, con un mayor riesgo de desarrollar tanto deterioro cognitivo leve como EA [4, 5]. Otros factores genéticos identificados sobre la base de GWAS y asociados a la aparición de sAD están representados por, por ejemplo, la apolipoproteína J (APOJ), la proteína de ensamblaje de clatrina de unión a fosfatidilinositol (PICALM), el receptor desencadenante expresado por células mieloides 2 (TREM2), el grupo de diferenciación 33 (CD33) y el receptor del complemento 1 (CR1) [4-7].

45 Recientemente, se ha atribuido un papel cada vez mayor a las comorbilidades metabólicas de la EA causadas por la malnutrición, especialmente en los países occidentales [8, 9]. Una de las comorbilidades del sAD identificadas hasta la fecha es la diabetes (tipo I o tipo II), una condición patológica común entre las poblaciones del mundo occidental, con una estimación de 176 millones de personas en todo el mundo afectadas actualmente por el tipo I (~5-10 % de los casos), por el tipo II (~90 % de los casos) o por otras formas de diabetes, por ejemplo, la diabetes gestacional [9, 10]. La diabetes de tipo II, que representa la mayor parte de los casos de diabetes en el mundo, es más frecuente en las personas mayores y está asociada a dietas muy energéticas y de baja calidad en el contexto de un estilo de vida sedentario, circunstancias que son comunes entre las poblaciones de los países occidentales industrializados. Las dietas de estos países suelen incluir alimentos baratos y muy procesados con un alto contenido en grasas saturadas, colesterol y carbohidratos simples, y carecen de minerales esenciales, oligoelementos y vitaminas [11-14]; por ejemplo, en las poblaciones occidentales, y sobre todo en las personas mayores, existen a menudo carencias crónicas, especialmente de magnesio, zinc y vitamina B, sobre todo de tiamina, ácido fólico o profármacos como la benfotiamina y la vitamina D, con carencias que van desde las asintomáticas -detectables sólo por determinaciones de laboratorio-

hasta estados carenciales clínicamente manifiestos con o sin síntomas específicos. Resulta sorprendente que el ~80 % de los pacientes con EA desarrollen intolerancia a la glucosa o diabetes durante el curso de la demencia [15, 16], lo que indica una interacción mutua [17]. Esto va acompañado de una disfunción mitocondrial, que puede ser (co)causal de demencia.

5 Además, las dietas occidentales combinadas con la falta de actividad física suelen conducir a la obesidad [14] y, en particular, el aumento de la acumulación de grasa visceral provoca metainflamación [18] (la llamada "inflamación fría"), lo que conduce a la liberación de citoquinas proinflamatorias IL1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  de los macrófagos y hepatocitos infiltrados, lo que provoca un deterioro metabólico sistémico [18, 19]. Tanto la obesidad como la diabetes exacerban o "alimentan" la patología de la EA [9, 11, 20].

10 Dado que, en una población que envejece, cada vez hay más pacientes que sufren trastornos metabólicos, como la diabetes y la obesidad (causada principalmente por la desnutrición sola o en combinación con la inactividad física), que son factores de riesgo importantes para el desarrollo de la demencia, en particular, de la EA, las deficiencias o la reducción de la ingesta de biofactores, especialmente de magnesio, zinc y vitamina B, en particular la tiamina, el ácido fólico, o profármacos como la benfotiamina y la vitamina D, son particularmente riesgosos para las personas mayores.  
15 Esto va unido a la alteración de los procesos metabólicos en las personas mayores (por ejemplo, atrofia muscular, etc.). En el estado de la técnica se describen los biofactores para el tratamiento y la profilaxis de la demencia. Por ejemplo, una deficiencia vitamínica, especialmente una deficiencia de vitamina B12, ya puede causar demencia (secundaria) (CIE10 (2019) de la OMS, F02.8). El solicitante se centra, como ya se ha explicado, en los siguientes compuestos o sustancias, a saber, el orotato de magnesio o de zinc, la vitamina D, en particular la vitamina D3  
20 (colecalfiferol) y la vitamina B, en particular, la tiamina, el ácido fólico, la vitamina B6 y B12 (cobalamina) y la benfotiamina.

Los orotatos, en particular, están demostrando ser vehículos prometedores de Zn y Mg, ya que pueden atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica. Los orotatos también son ventajosos porque, por ejemplo, tanto el orotato de magnesio como el orotato de zinc, en particular, pueden pasar/permeabilizar fácilmente a través de la membrana  
25 celular y también son absorbidos preferentemente por las mitocondrias y el núcleo celular [21]. La estimulación resultante del suministro de energía, por ejemplo, la producción de ATP en las mitocondrias, es ventajosa, ya que la demencia, especialmente la EA, puede ser causada (en parte) por una disfunción mitocondrial (supra).

Además, en el estado de la técnica se describen preparados combinados de los biofactores mencionados para el tratamiento y la profilaxis de la demencia.

30 De esta manera, el documento US20150132273A1 describe el treonato de magnesio en combinación con biofactores para el tratamiento del deterioro cognitivo. Sin embargo, el treonato resulta ser un vehículo ineficiente para el magnesio o el zinc, ya que el propio treonato se degrada rápidamente en varias vías metabólicas.

En el documento WO 2017/179644 A1 se describe el uso de sales de magnesio, pero no de orotato de magnesio, en combinación con biofactores para el tratamiento de la demencia. El documento WO 2017/059895 A1 divulga en el  
35 ejemplo 1 un preparado de L-5-metiltetrahydrofolato (100-800 pg de ácido fólico equivalente) vitamina B3 (4-40 mg), vitamina B2 (0,4-5 mg), metilcobalamina, (0,5-10 pg), vitamina B6 (0,4-5 mg), trimetilglicina (100-2000 mg), bisglicinato de zinc 5-50 mg) y N-acetilcisteína (100-2000 mg) para el tratamiento de la demencia.

Mischoulon et al [22] divulga el folato para el tratamiento de la demencia, incluida la demencia senil después de la enfermedad de Alzheimer y para la profilaxis de la misma. Se describe una administración de 15 mg al día a los  
40 pacientes.

El documento DE 20 2017 006840 U1 desvela suplementos dietéticos que contienen de 0,1 a 3 g de orotato de zinc dihidrato y de 1 a 15 mg de ácido fólico, en forma de comprimido efervescente, bebida o polvo para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la demencia o el síndrome de fatiga, sin embargo, no se desvela el orotato de magnesio.

45 El documento WO2010145644A2 desvela composiciones que contienen ácido orótico con una sustancia portadora, por ejemplo ácido fólico, para el tratamiento de la demencia, pero no se desvela el orotato de magnesio.

El documento US6420342B1 describe composiciones alimenticias que contienen ácido fólico y orotato, por ejemplo orotato de sodio para el tratamiento de enfermedades cardíacas o cardiovasculares, así como Alzheimer o cansancio crónica (fatiga), pero no se desvela el orotato de magnesio.

50 BUCK G, "NO SÓLO EL MAGNESIO, TAMBIÉN EL ÁCIDO ORÓTICO AYUDA CON LOS PROBLEMAS CARIOLÓGICOS", ZFA. ZEITSCHRIFT FUER ALLGEMEIN MEDIZIN, HIPPOKRATES VERLAG, STUTTGART, vol. 68, nº 12, página 396, desvela que no sólo el magnesio sino también el ácido orótico ayuda en problemas cardíacos como la insuficiencia cardíaca crónica y menciona resultados clínicos positivos con orotato de magnesio para estas enfermedades, pero no para la demencia.

Ma Fei y col. "La suplementación con ácido fólico mejora la función cognitiva al reducir los niveles de citoquinas

inflamatorias periféricas en sujetos chinos de edad avanzada con deterioro cognitivo leve”, vol. 6, no. 1, 37486, SCIENTIFIC REPORTS, Nature (2016) desvelan que la suplementación con ácido fólico aumenta la función cognitiva, pero no se desvela el orotato de magnesio.

- 5 Cihák Alois y col. "Chapter 8 - Physiological Effects", Orotic Acid, 1.ª edición, MTP Press Limited, página 36, párrafo 3 (ISBN 978-94-009-8045-7) desvelan el ácido orótico para el tratamiento de la hepatitis experimental in vivo, pero el orotato de magnesio y el ácido fólico no se desvelan

Sobre la base de este estado de la técnica, la presente invención tiene por objeto proporcionar combinaciones de biofactores particularmente adecuadas y eficaces para el tratamiento y la profilaxis de la demencia, en particular, para la terapia o la profilaxis a largo plazo.

- 10 A este fin, la solicitante ha realizado amplios estudios en modelos preclínicos de EA, que demuestran la idoneidad de las combinaciones de biofactores para la profilaxis y el tratamiento de la demencia, en particular de la EA.

Las células de neuroblastoma immortalizadas, es decir, las células humanas SY- SY5Y-APP695, sobreexpresan el gen neuronal APP humano, de modo que se produce una mayor formación de  $\beta$ -amiloide.

- 15 El nematodo *C. Elegans* (CL2006) expresa amiloide  $\beta$  humano (1-42) bajo el control de un promotor específico de los músculos, lo que provoca la parálisis progresiva del gusano. La duración de la vida se reduce y el gusano muestra depósitos característicos de  $\beta$ -amiloide.

Las ratas con Alzheimer TgF344-AD fueron sometidas a pruebas de actividad de fosforilación oxidativa mitocondrial a los 6-7 y 15-16 meses en comparación con las de tipo salvaje.

Los resultados se explican y se muestran en los ejemplos y las figuras.

- 20 Sorprendentemente, una composición de orotato de magnesio y ácido fólico en células de neuroblastoma immortalizadas, concretamente las células humanas SY-SY5Y-APP695, mostró una inhibición superaditiva de la formación de  $\beta$ -amiloide (Figura 1A).

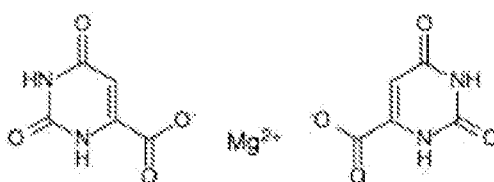
Este resultado se observa especialmente también en la capacidad de esta combinación para normalizar la producción de ATP en las mitocondrias y contrarrestar la disfunción mitocondrial causante.

- 25 Por lo tanto, la invención se refiere a una composición, en particular, a un medicamento o complemento alimenticio o dieta equilibrada, que comprende o consiste en orotato de magnesio y ácido fólico para su uso en la profilaxis y el tratamiento de la demencia (en adelante: composición de acuerdo con la invención).

- 30 Los estudios antes mencionados demuestran que, además del orotato de magnesio y del ácido fólico, un "cóctel" de orotato de magnesio o de zinc, de vitamina D, en particular de vitamina D3 (colecalfiferol) y de vitamina B, en particular, de tiamina, de ácido fólico, de vitaminas B6 y B12 (cobalamina) y de benfotiamina, favorecen el efecto al menos de forma aditiva.

Por lo tanto, también se incluyen otras combinaciones de acuerdo con la invención, en las que al menos dos o tres o cuatro o cinco o seis sustancias o todas las sustancias se seleccionan del grupo orotato de magnesio, orotato de zinc, vitamina D3, vitamina B6, ácido fólico, vitamina B12 y benfotiamina.

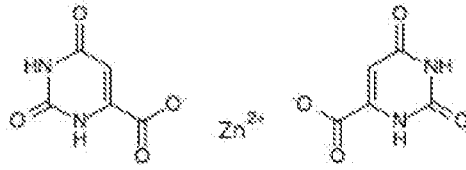
- 35 El orotato de magnesio es una sal del ácido orótico (o 6-carboxiuracilo) con la fórmula



Orotato de magnesio

y está disponible en el mercado, por ejemplo, en Wörwag Pharma GmbH (Böblingen, Alemania).

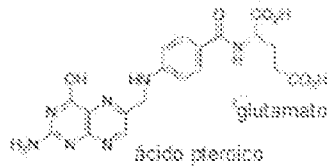
El orotato de zinc es una sal del ácido orótico (o 6-carboxiuracilo) con la fórmula



Orotato de zinc

y está disponible en el mercado, por ejemplo, en Wörwag Pharma GmbH (Böblingen, Alemania).

El ácido fólico (o ácido pteroil-mono-glutámico) es la vitamina B9



5 o los tautómeros ácido (2S)-2-[(4-[(2-amino-4-oxo-1H-pteridin-6-il)metilamino]- benzoil)amino]pentanodioico (Lactam) o ácido (2S)-N-(4-[[2-amino-4-hidroxipteridin-6-il]metil]amino)benzoil)glutámico (Lactim) y pueden estar presentes como folatos, con 2-7 residuos de glutamilo presentes. Además, los folatos pueden estar hidrogenados en la pteridina, como el 5, 6, 7, 8-tetrahidrofolato o sustituidos (por ejemplo, metil-, como el 5-metiltetrahidrofolato y otros). De acuerdo con la invención, tales folatos (o equivalentes de ácido fólico) están incluidos en el término ácido fólico. También se incluyen de acuerdo con la invención los tautómeros y las sales del ácido fólico. Se prefiere el ácido fólico producido pro síntesis de acuerdo con la invención.

15 La benfotiamina es un profármaco lipofílico de la tiamina (vitamina B1), por lo que es una provitamina, y es comercializada, por ejemplo, por el solicitante como milgamma protekt® para el tratamiento de neuropatías y trastornos cardiovasculares causados por la deficiencia de vitamina B1.

En otra realización preferida del agente de acuerdo con la invención, la relación molar entre el orotato de magnesio y el ácido fólico es preferentemente 2-25:1, en particular, 20:1.

Las vitaminas B y D se refieren a las vitaminas D2 y D3 y B1 a B12 disponibles en el mercado.

20 Las sustancias mencionadas pueden utilizarse en sus formas fisiológicamente activas, comprender sales, cofactores e hidratos, o estereoisómeros, tautómeros (por ejemplo, R, S, Z, E), etc.

25 En el contexto de la presente invención, se entiende que la(s) demencia(s) incluye(n), pero sin ser limitativo, la demencia de la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Alzheimer, la demencia de la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano (tipo 2), la demencia de la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (tipo 1), la demencia de la enfermedad de Alzheimer atípica o de inicio mixto, la demencia vascular, la demencia de la enfermedad de los cuerpos de Lewy, estando todas ellas incluidas en la invención. Estas formas de demencia se describen en la "Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud", 10ª revisión (2019) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el capítulo V "Trastornos mentales y del comportamiento" en F00-03 (supra).

30 Todas las indicaciones mencionadas se describen, por ejemplo, en el Pschyrembel, 267ª edición 2017, De Gruyter (Berlín).

El agente activo que contiene la combinación de orotato de magnesio y ácido fólico de acuerdo con la invención puede ahora utilizarse ventajosamente para el tratamiento y la profilaxis de un paciente o individuo enfermo, animal, mamífero o preferentemente humano, concretamente para el tratamiento y la profilaxis de la demencia (enfermedades).

Los agentes pueden administrarse en cualquier cantidad y dosis.

35 La formulación galénica del agente de acuerdo con la invención puede seleccionarse del grupo que consiste en: gotas, jugos, jarabes, comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas, formulaciones de liberación prolongada, infusiones, pomadas, emulsiones, talcos o polvos. Por supuesto, la formulación puede contener excipientes farmacéuticos habituales.

En otra realización, la invención se refiere a un medicamento que comprende un agente de acuerdo con la invención para su uso o aplicación en el tratamiento y la profilaxis de la demencia (enfermedad).

5 Otra realización preferida se refiere a un complemento alimenticio que contiene el agente de acuerdo con la invención, en particular, en forma de composición dietética o dieta equilibrada para el tratamiento y la profilaxis de la demencia (enfermedades). Los alimentos o productos alimenticios adecuados de acuerdo con la invención, incluida el agua, son aquellos que no se definen exhaustivamente en el Reglamento (CE) nº 178/2002 de 28 de enero de 2002, como los productos de panadería y las bebidas y preparados alimenticios para bebés. El complemento alimenticio de acuerdo con la invención puede mezclarse con un portador adecuado fisiológicamente aceptable.

10 Los preparados farmacéuticos de acuerdo con la invención pueden prepararse en forma de unidades de dosificación. Esto significa que los preparados se presentan en forma de porciones individuales, preferentemente cápsulas y ampollas, cuyo contenido de principio activo corresponde a una fracción o un múltiplo de una dosis única. Las unidades de dosificación pueden contener, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 dosis individuales o 1/2, 1/3 o 1/4 de una dosis individual. Preferentemente, una dosis individual contiene la cantidad del agente de la invención administrada en una aplicación, que suele corresponder a un entero, un medio, un tercio o un cuarto de una dosis diaria. Se prefiere una dosis de tres veces al día, preferiblemente en forma de comprimido o gotas, en particular por la mañana, al mediodía y por la noche, si es necesario con las comidas.

20 Se entiende por excipientes no tóxicos e inertes aceptables para uso farmacéutico los diluyentes sólidos, semisólidos o líquidos, las cargas y los auxiliares de formulación de cualquier tipo, como a) cargas y extensores, por ejemplo almidones, lactosa, azúcar de caña, glucosa, manitol, dextrinas, maltodextrina y sílice, dióxido de silicio altamente disperso, b) aglutinantes, por ejemplo, carboximetilcelulosa, celulosa en polvo, celulosa microcristalina, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, c) humectantes, por ejemplo, glicerina, d) desintegrantes, por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio y carbonato de sodio, e) retardadores de la disolución, por ejemplo, parafina, y f) aceleradores de la absorción, por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, g) agentes reticulantes, por ejemplo alcohol cetílico, monoestearato de glicerina, h) adsorbentes, por ejemplo caolín y bentonita e i) lubricantes, por ejemplo talco, estearato de calcio y magnesio y polietilenglicoles sólidos o mezclas de las sustancias enumeradas en los apartados a) hasta i).

30 Los comprimidos, las tabletas recubiertas, las cápsulas, las píldoras y los gránulos pueden estar provistos de los recubrimientos y las fundas habituales que contienen opcionalmente agentes opacificantes, por ejemplo, no concluyentemente, hipromelosa, celulosa microcristalina, ácido esteárico, dióxido de titanio, y también pueden estar compuestos de forma que liberen el o los principios activos sólo o preferentemente en una parte específica del tracto intestinal, opcionalmente de forma retardada, en la que se pueden utilizar, por ejemplo, sustancias poliméricas y ceras como sustancias incrustantes.

Por lo tanto, la invención también se refiere a una preparación farmacéutica que contiene un agente de acuerdo con la invención junto con sustancias auxiliares y aditivos.

#### Ejemplos y figuras:

35 Los siguientes ejemplos y figuras sirven únicamente para explicar la invención sin limitar la invención a estos ejemplos.

#### **Ejemplo 1:**

Modelo celular:

#### Cultivo de células:

40 Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y utilizadas fueron transfectadas de forma estable con ADN de APP695 humano de tipo salvaje (Grewal R, Reutzel M, Dilberger B et al. (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 et al. (2014) Un modelo celular para la fase inicial de la enfermedad de Alzheimer esporádica. J Alzheimers Dis 42: 395-411).

45 Las células SH-SY5Y-APP se cultivaron a 37°C bajo una atmósfera del 5 % de CO<sub>2</sub> en un medio de cultivo (DMEM) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal de ternera inactivado por calor, 60 pg/ml de estreptomina, 60 unidades/ml de penicilina, 0,3 mg/ml de higromicina, aminoácidos no esenciales del MEM y 1 mM de piruvato sódico al 1 %. Las células se pasaron cada 3 días y se utilizaron cuando alcanzaron el 70-80 % de confluencia.

Las células se incubaron con orotato de magnesio 200 pM, ácido fólico 10 pM y su combinación durante 24 horas. La incubación con DMEM sirvió de control.

#### 50 Medición de Aβ 1-40:

Tras 24 horas de incubación, se recogió el medio en los frascos de cultivo celular y se enjuagaron las células con PBS

frío. A continuación, la suspensión se centrifugó a 220 g durante 5 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los gránulos celulares en 1,5 ml de PBS y de inhibidor de la proteasa. A continuación, se centrifugó la solución a 112 g durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se recogió el sedimento celular y se añadieron 600 µl de tampón de extracción celular (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y se incubaron durante 30 minutos. A continuación, la suspensión se centrifugó a 13.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se almacenó a -80°C. Los sobrenadantes se descongelaron en hielo y se pipetearon en una placa 384 (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). Se utilizó un kit HTRF de beta amiloide 1-40 (Cisbio, Codolet, Francia) para detectar la concentración de beta amiloide. Las muestras se utilizaron según las instrucciones del fabricante. A continuación se midió la densidad óptica a 665 y 622 nm. A continuación, los valores de beta amiloide se normalizaron con respecto al contenido de proteínas.

Quantificación de proteínas:

El contenido de proteínas se determinó utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante. Se utilizó la albúmina de suero bovino como estándar. El protocolo se basa en una publicación de Smith et al. (Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry 150: 76-85).

Nematodo (Caenorhabditis elegans) C. elegans y cepas bacterianas

La cepa N2 de tipo salvaje de C. elegans se obtuvo del Centro de Genética de Caenorhabditis elegans (Universidad de Minnesota, MN, EE.UU.). Los nematodos se mantuvieron en placas de agar de crecimiento de nematodos (NGM) cultivadas con E. coli OP50 a 20 °C según los protocolos estándar (Brenner S (1974) The genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics 77: 71-94). Se generaron poblaciones sincrónicas para todos los experimentos utilizando un protocolo estándar de blanqueo (Theresa Stiernagle (2006) Maintenance of C. elegans. WormBook: 1-11).

Cultivo y tratamiento:

Las larvas sincronizadas se lavaron dos veces en tampón M9, se contaron y se ajustaron a 10 larvas por 10 µL. Los nematodos se pipetearon en placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania). La concentración de OP50 se ajustó a 1 en la densidad óptica OD600 con nematodos líquidos. Se añadió OP50-NGM como fuente de alimentación normalizada, utilizando 4,4 veces el volumen de larvas con solución M9. Las larvas L1 se mantuvieron a 20 °C con agitación constante y alcanzaron la edad adulta en 3 días. Los efectores se añadieron tras alcanzar la edad adulta joven 48 h antes del experimento. Los efectores fueron 100 µM de orotato de magnesio y 50 µM de ácido fólico disueltos en M9. Se aplicó el tampón M9 como control.

Resistencia al estrés térmico:

Se cultivaron aproximadamente 10 nematodos por pozo en una microplaca de 96 pocillos, como se ha mencionado anteriormente. Tras 48 horas de incubación, se aplicaron los efectores como se ha descrito anteriormente. El tiempo hasta la muerte de los nematodos se determinó utilizando un ensayo de tolerancia térmica en microplaca como se describe en Fitzenberger et al. (Fitzenberger E, Deusing DJ, Marx C et al. (2014) El polifenol quercetina protege al mutante mev-1 de Caenorhabditis elegans de la reducción de la supervivencia inducida por la glucosa bajo estrés térmico en función de SIR-2.1, DAF-12 y la actividad proteasomal. Molecular nutrition & food research 58: 984-994).

Los nematodos se lavaron de los pocillos con tampón M9 en tubitos de 15 mL, seguidos de tres lavados adicionales. En cada pocillo de una placa de microtitulación negra de 384 pocillos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania), se añadieron 6,5 µL de solución tampón M9/Tween® 20 (1% v/v). Posteriormente, se pipeteó 1 µL de tampón M9 en cada pocillo con un nematodo bajo un estereomicroscopio (Breukhoven Microscope Systems, Capelle aan den IJssel, Países Bajos) y se mezcló con 7,5 µL de SYTOX™ green (concentración final 1 M; Life Technologies, Karlsruhe, Alemania). Para evitar la evaporación del agua, las placas se sellaron con una película de sellado Rotilab (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania). Se indujo un choque térmico (37 °C) y se midió la fluorescencia con un lector de placas ClarioStar (BMG, Ortenberg, Alemania) cada 30 minutos durante un periodo de 17 h. Para detectar la fluorescencia verde del SYTOX™, la longitud de onda de excitación se fijó en 485 nm y la emisión se detectó a 538 nm.

**Ejemplo 2:**

Fosforilación oxidativa (OxPhosC) de las mitocondrias aisladas del hipocampo de ratas transgénicas F344-AD después del tratamiento.

Tras la decapitación de las ratas F344-AD, se aísla el hipocampo y se homogeneiza a 4°C. A continuación se trata el hipocampo con OxPhosC. Tras los pasos de centrifugación, las mitocondrias aisladas se colocan en la cámara de un respirómetro. Mediante la adición sucesiva de sustratos e inhibidores de la cadena respiratoria, la influencia sobre el consumo de oxígeno en la cámara puede medirse en un electrodo de platino y, de este modo, los complejos individuales pueden examinarse de forma aislada en cuanto a su actividad (preparado por Tina M. Schwarzkopf, Konrad A. Koch, Jochen Klein, Neurodegeneración tras isquemia cerebral transitoria en ratones envejecidos: efectos

beneficiosos de la bilobalida, Brain Research, Vol. 1529, 5 de septiembre de 2013, Páginas 178-187 con más referencias).

Leyenda	Tratamiento	Dosificación
A, E (control)	Sin aditivos	0
B	Orotato de magnesio	500 mg/kg
C	Benfotiamina	300 mg/kg
D, F (cóctel)	Orotato de magnesio	500 mg/kg
	Benfotiamina	300 mg/kg
	Vitamina B12	1 mg/kg
	Ácido fólico	10 mg/kg
	Vitamina D3	3000 U.I./kg

Los resultados se muestran en la figura 3.

5 La figura 1 muestra la cantidad de péptido beta-amiloide (A $\beta$ 1-40) en pg/mg de proteína en SH-SY5Y-APP695 después de 24 horas de incubación con los agentes A.) ácido fólico (Fol; 10 pM) y orotato de magnesio (200 pM) y su combinación y B.) ácido fólico (Fol; 10 pM) y orotato de zinc (200 pM) y su combinación. Se presentan los valores medios respectivos de 6 experimentos independientes (n=6) y los errores estándar asociados ( $\pm$  SEM).

Las significaciones (\*\*p < 0,001 o \*\*\*\*p < 0,0001) se determinaron mediante un ANOVA de una vía. La línea de puntos indica el valor medio del control (217,4 pg/mg A $\beta$ ).

10 De la figura 1A resulta un efecto sinérgico para el ácido fólico y el orotato de magnesio, como: A combinación > A orotato de magnesio + A Fol.

15 La figura 2 muestra la duración de la vida de *C. elegans* en el ensayo de estrés térmico tras el tratamiento con orotato de magnesio y ácido fólico ("Fol") y su combinación en forma de curvas de Kaplan-Meier. Los gusanos no tratados sirvieron de control (M9 [control]). Se muestran los valores medios respectivos y los errores estándar asociados ( $\pm$  SEM). La significación (\*\*p < 0,01) se calculó mediante la prueba de log-rank (Mantel-Cox).

20 La figura 3 muestra la capacidad (U.I. = pmol/min) de fosforilación oxidativa (OxPhosC) de las mitocondrias aisladas del hipocampo de ratas transgénicas F344-AD. Los cuatro tratamientos (B, C, D, F) y los dos grupos de edad (6-7 meses, 15-16 meses) se representan en las abscisas. Entre los animales de 6-7 meses, no hay diferencias significativas en la OxPhosC debido a los tratamientos, aunque el tratamiento con el cóctel (grupo D) provoca un aumento de la OxPhosC. La OxPhosC relacionada con la edad disminuye de forma estadísticamente significativa (comparar el grupo A con el grupo E). Este efecto de la edad puede estar estadísticamente influenciado o anulado por el tratamiento con el cóctel (comparar el grupo E con el grupo F).

Referencias

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, Moskvin 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, Thornton-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, Buross 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, Seiten 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 Müller-Werdan, Mario Ost, Kristina Norman, Age-related fatigue is associated with reduced mitochondrial function in peripheral blood mononuclear cells. *Exp. Gerontology* 2021. Vol. 144

**REIVINDICACIONES**

1. Agentes que comprenden orotato de magnesio y ácido fólico o folatos o tautómeros y sales de los mismos para su uso en la profilaxis y el tratamiento de la demencia.
2. Agentes para uso en la profilaxis y el tratamiento de una demencia de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionada entre demencia de Alzheimer o enfermedad de Alzheimer, demencia en la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano (tipo 2), demencia en la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía (tipo 1), demencia en la enfermedad de Alzheimer con forma atípica o mixta, demencia vascular, demencia en la enfermedad de los cuerpos de Lewy.
3. Agentes para uso en la profilaxis y el tratamiento de una demencia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la relación molar entre el orotato de magnesio y el ácido fólico es de 2 a 25:1, en particular, de 20:1.
4. Agentes para uso en la profilaxis y el tratamiento de una demencia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición comprende adicionalmente al menos una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en orotato de zinc, benfotiamina, vitamina D y vitamina B.
5. Agentes para uso en la profilaxis y el tratamiento de una demencia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición comprende adicionalmente al menos una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en orotato de zinc, vitamina D3, tiamina, vitamina B6, vitamina B12 y benfotiamina.
6. Agentes para el uso en la profilaxis y el tratamiento de una demencia de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es un medicamento o un complemento alimenticio o una dieta equilibrada.
7. Preparaciones farmacéuticas que contengan un agente para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, dado el caso junto con excipientes adecuados, en particular, en forma de gotas, jugo, jarabe, comprimidos, grageas, cápsulas, formulaciones de liberación prolongada, infusiones, ungüentos, emulsiones, talcos, polvos.
8. Preparaciones farmacéuticas que contienen un agente para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, junto con excipientes y aditivos.

Figuras

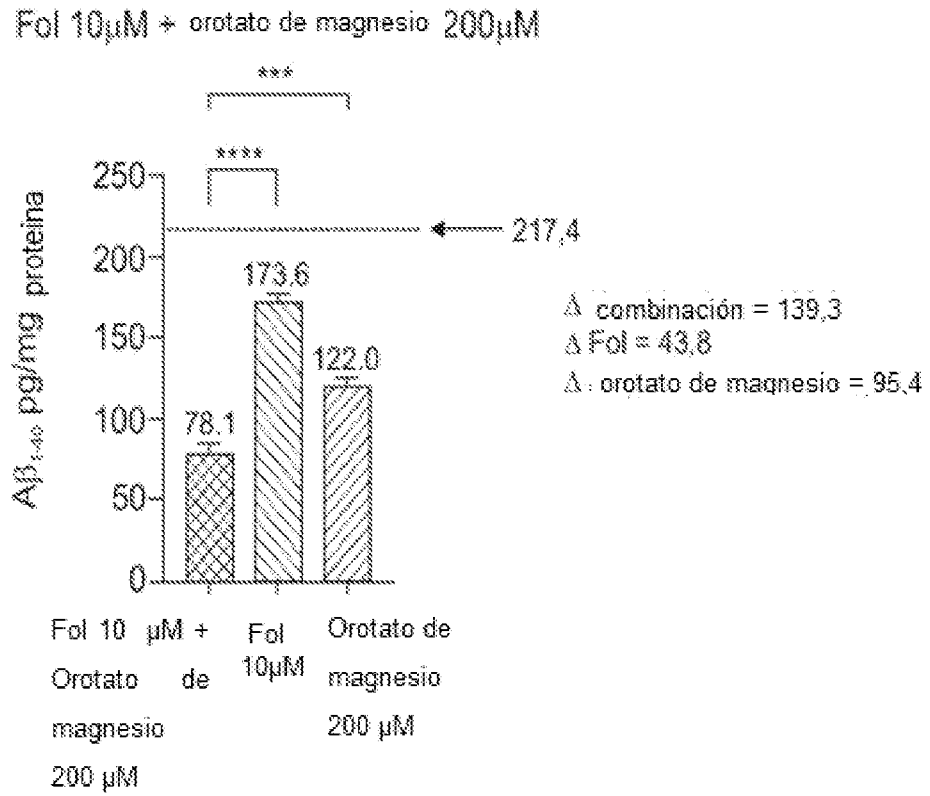


Fig. 1A

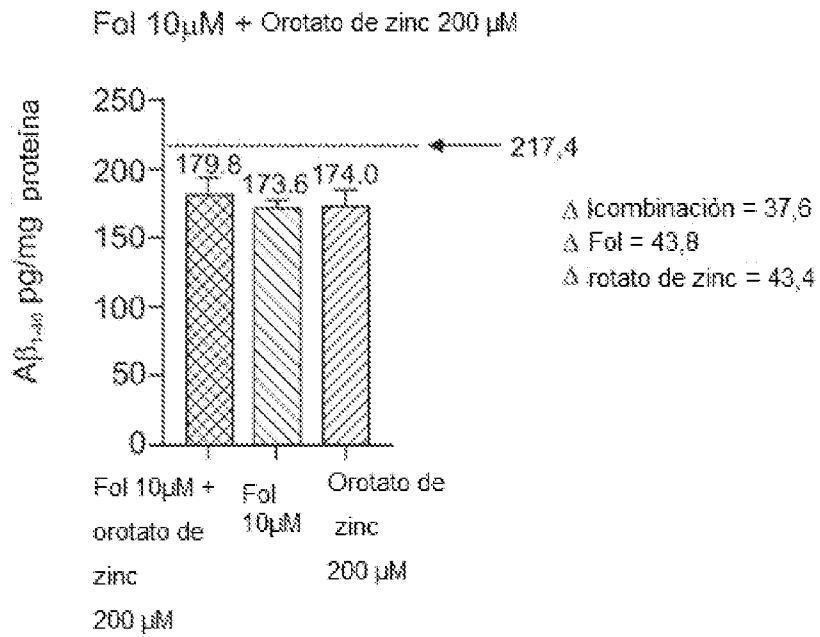


Fig. 1B

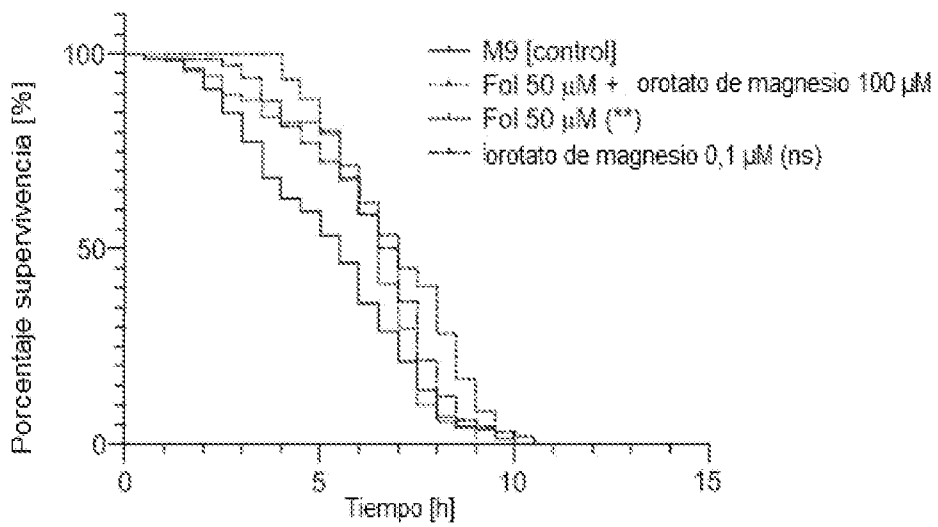
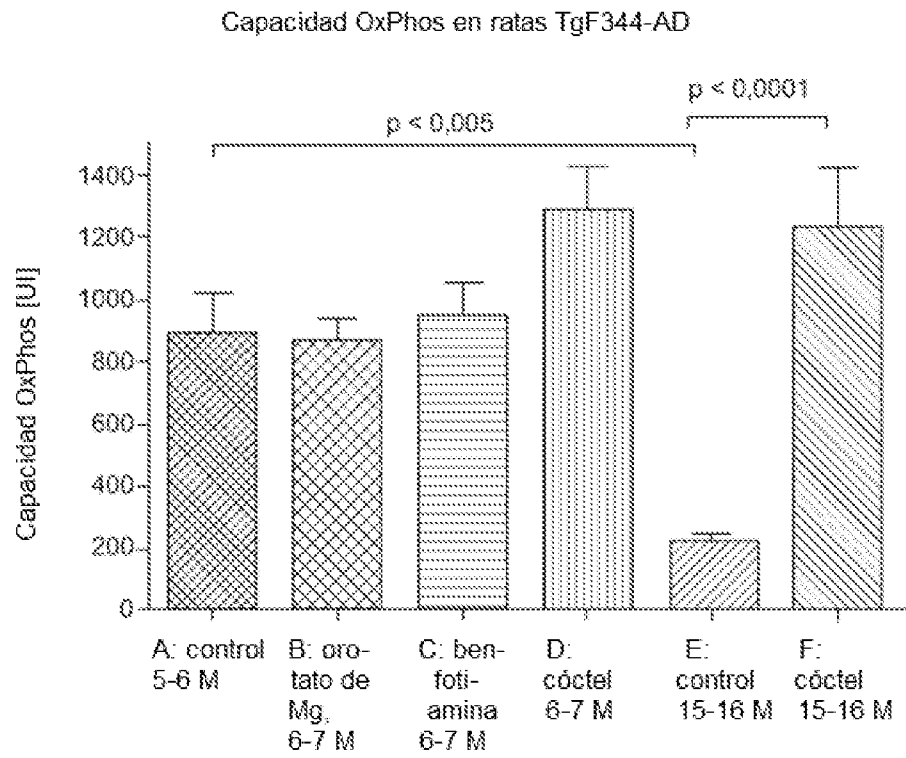


Fig. 2



n = 4-8

Fig. 3