

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 651**

51 Int. Cl.:

A61K 31/714 (2006.01)

A61K 31/4415 (2006.01)

A61K 31/375 (2006.01)

A61K 31/355 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2018** **PCT/CN2018/077107**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2018** **WO18161808**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2018** **E 18763903 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024** **EP 3593805**

54 Título: **Uso de una composición vitamínica para preparar un fármaco para prevenir, tratar o retrasar la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

07.03.2017 CN 201710131111

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2024

73 Titular/es:

**ZENSUN (SHANGHAI) SCIENCE AND
TECHNOLOGY, CO., LTD. (100.0%)
No.68 Ju Li Road Zhangjiang Hi-Tech Park
Shanghai 201203, CN**

72 Inventor/es:

ZHOU, MINGDONG

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 989 651 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

Uso de una composición vitamínica para preparar un fármaco para prevenir, tratar o retrasar la enfermedad de Alzheimer

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una composición de vitaminas, en particular una composición que comprende una composición de vitaminas B y una composición de vitamina C para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer promoviendo el metabolismo energético. La presente composición es adecuada para la prevención, tratamiento o retraso de la enfermedad de Alzheimer, y la composición puede mejorar la capacidad de aprendizaje y de memoria y las deficiencias cognitivas.

Antecedentes de la invención

- 10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso central, normalmente se produce en personas mayores de 65 años, que se caracteriza por disminución cognitiva progresiva y deterioro conductual, y es el tipo más común de demencia senil. En la actualidad, la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer no está completamente clara, los trastornos metabólicos pueden ser una de las razones de la enfermedad de Alzheimer. El azúcar es la principal fuente de metabolismo en el cuerpo, y el metabolismo anormal de la glucosa provocará una serie de deterioros de las funciones tisulares, en las que el tejido cerebral con glucosa como la principal fuente de energía es extremadamente susceptible al metabolismo anormal de la glucosa. Numerosos estudios han mostrado que existe disfunción metabólica en pacientes con EA, al mismo tiempo, la reducción de la tasa metabólica cerebral también es uno de los síntomas más tempranos de la EA, los cambios ocurren antes de que cualquier trastorno funcional pueda detectarse mediante una prueba neuropsiquiátrica. El examen de imagenología mostró que la atrofia cerebral, los trastornos metabólicos y otras anomalías fisiológicas aparecieron al mismo tiempo en pacientes con EA, y las anomalías metabólicas empeoraron con la progresión de la enfermedad. También se ha encontrado que el mecanismo potencial del metabolismo anormal de la glucosa puede estar relacionado con la toxicidad directa de la hiperglicemia, el suministro insuficiente de energía en el cerebro causado por la hipoglucemia, la resistencia a la insulina, la anomalía en la transducción de la señal de insulina y la anomalía del gen de la enzima de degradación de la insulina. Se ha confirmado que la caída de la tasa metabólica de la glucosa en el lóbulo frontal y temporal y la corteza cingulada parietal se puede observar varios años antes de la demencia mediante la formación de imágenes del metabolismo de la glucosa por FDG-PET, lo que sugiere que el trastorno del metabolismo de la glucosa cerebral está estrechamente relacionado con la EA, y el trastorno del metabolismo es probable que sea una razón de la causa y el desarrollo de la EA, por lo tanto, es posible prevenir y reducir la aparición de EA mejorando el metabolismo de la energía cerebral.

- La glicólisis de la glucosa y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos son las principales rutas metabólicas de la capacidad de producción de glucosa (ATP) en el cuerpo. La reacción completa de estas dos vías de metabolismo energético requiere la participación de diversas enzimas metabólicas, y la actividad de estas enzimas metabólicas depende de la participación de coenzimas. La piruvato deshidrogenasa es un complejo multienzimático en la matriz mitocondrial. Esta enzima es una enzima clave que cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetyl-CoA. El proceso de reacción catalizado por PDH enlaza la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la formación de ATP. La citrato deshidrogenasa mitocondrial es la enzima limitante de la velocidad en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato en ácido α -cetoglutarico. El H^+ eliminado en la reacción catalítica reduce el NAD^+ a NADH. Es la primera etapa generar CO_2 en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y también es una reacción irreversible, y es una etapa importante limitante de la velocidad en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La alfa-cetoglutarato deshidrogenasa (α -KGDH) que se localiza en la matriz mitocondrial es una enzima limitante de la velocidad implicada en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Es importante para mantener la constante oxido-reductora del tejido cerebral, y el cambiador de actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa está estrechamente relacionado con enfermedades neurodegenerativas. La succinato deshidrogenasa es la sexta enzima en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que está directamente unida a la cadena de transporte de electrones. La succinato deshidrogenasa, el dinucleótido de flavina-adenina, el citocromo y las proteínas 3 Fe-S son los componentes principales para constituir el complejo mitocondrial II, que desempeña un papel importante en el metabolismo de los azúcares y la cadena respiratoria oxidativa. La SDH existe en la membrana interna mitocondrial y es un marcador de la membrana interna mitocondrial. Su actividad indica el estado metabólico de los tejidos y la función mitocondrial. SDHA codifica flavoproteínas y es una subunidad de succinato deshidrogenasa. Como enzima clave implicada en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la succinato deshidrogenasa es una de las enzimas marcadoras que indica la función mitocondrial, y su actividad se usa generalmente como indicador para evaluar el estado de funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. ATP5B codifica una subunidad de la ATP sintetasa y está implicada en el transporte de iones hidrógeno en las mitocondrias. La ATP sintetasa es un tipo de sintetasa en mitocondrias y una enzima clave para el metabolismo energético en organismos.

Las vitaminas son una serie de compuestos orgánicos esenciales en el metabolismo de los seres humanos, principalmente responsables del mantenimiento y regulación del metabolismo normal del cuerpo. Son micronutrientes que son necesarios por los organismos vivos. Generalmente no son producidos por los propios organismos y necesitan

ser obtenidos por medio de la dieta. Las vitaminas no pueden producir energía y constituir células como los azúcares, las proteínas y las grasas, pero regulan el metabolismo del organismo y mantienen la salud del cuerpo.

Se sabe que muchas vitaminas están implicadas en el proceso de metabolismo y son elementos indispensables en las reacciones bioquímicas del cuerpo. Las vitaminas B son sustancias indispensables que promueven el metabolismo en el cuerpo y convierten los azúcares, grasas, proteínas, etc. en calor. La mayoría de ellos participan en el proceso metabólico en forma de coenzimas. Una vez que se produce deficiencia de vitamina B en el cuerpo, la función celular disminuirá inmediatamente, causando trastornos metabólicos. Algunos de los miembros de la vitamina B, tales como la vitamina B1, se denominan incluso vitaminas psicotrópicas debido a sus buenos efectos sobre el tejido nervioso y el estado mental. Los miembros de la vitamina B que incluyen B1, B2, B3, B5, B6, B7 y B12 están directamente implicados en la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos durante el metabolismo de la glucosa. Una vez que estas vitaminas son deficientes, esta ruta metabólica está destinada a provocar una serie de enfermedades asociadas con trastornos metabólicos. Estudios han demostrado que las vitaminas B1, B2, B3, B5, B6, B7 y B12 están directamente implicadas en el proceso de metabolismo energético. También participan en la patogénesis de la EA, tal como la reducción de la producción de amiloide (A β), la promoción del metabolismo de la homocisteína (Hcy), la reducción del nivel del factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la ayuda en la síntesis de neurotransmisores. Por lo tanto, estos miembros de la vitamina B pueden afectar a la aparición, desarrollo y progreso patológico de la EA regulando el nivel de metabolismo energético en el cerebro, y pueden ser uno de los métodos de tratamiento potenciales para la EA.

Además de las vitaminas B, estudios clínicos han demostrado también que la suplementación con algunas vitaminas liposolubles, tales como las vitaminas D, E y K, puede reducir el riesgo de síndrome metabólico, reducir los niveles de glucosa en sangre en ayunas, inducir la secreción de insulina y aumentar el metabolismo de la glucosa en el cerebro. Además, también redujeron los niveles de A β y TNF- α en el cerebro de animales con EA y mejoraron la función cognitiva en pacientes con EA. Muestra que este tipo de vitaminas puede ejercer sus efectos tanto sobre el metabolismo energético como sobre la función nerviosa al mismo tiempo, y también sugiere que puede haber alguna relación entre ellas. Por lo tanto, tomando estas vitaminas es posible regular el metabolismo energético en el cerebro de pacientes con EA para mejorar los síntomas de la EA. Los microelementos son uno de los componentes indispensables en el cuerpo, y también se ha notificado que algunos microelementos participan en el metabolismo energético y la progresión de la EA. Estudios clínicos han mostrado que el nivel de magnesio en el cerebro de pacientes con EA es significativamente menor, y más ingesta de magnesio reduce el riesgo de EA. Estudios con animales mostraron que después de 10 min de hipoxia en ratas, el nivel de ATP en el área de CA1 fue sólo el 16% del normal, mientras que el nivel de ATP en cortes de cerebro tratados con iones magnesio fue el 32% de los cortes de cerebro normales, y se consideró que el magnesio mejoraba significativamente la disminución de los niveles de ATP en la región de CA1 por hipoxia. Por lo tanto, la regulación del nivel de magnesio en el cerebro puede prevenir la deficiencia del metabolito energético ATP en el cerebro, mejorando de este modo la función neurológica en el cerebro.

A través de investigaciones básicas previas, se ha confirmado gradualmente que las vitaminas son beneficiosas para el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades. En aplicaciones clínicas, se pueden usar diversas vitaminas no sólo como terapia primaria o adyuvante, sino también como suplemento dietético para promover la salud y prevenir enfermedades. Con respecto a las enfermedades neurológicas, las vitaminas tales como las vitaminas B1, B3, B6, B9, B12, C y E pueden promover el desarrollo neurológico y el metabolismo de la homocisteína (la homocisteína elevada es uno de los factores de riesgo de la EA), regular la síntesis de neurotransmisores, prevenir trastornos neurológicos causados por anemia perniciosa, y mejorar trastornos neurológicos. Son especialmente importantes para mantener la salud del tejido nervioso. En aplicaciones clínicas, estas vitaminas tienen efectos terapéuticos significativos sobre enfermedades del sistema nervioso (beriberi seco), enfermedad de neuritis periférica y reducción del estrés oxidativo (una posible patogénesis de la EA).

En términos de metabolismo energético, las vitaminas B1, B2, B3, B5, B7, B6, B9 y B12 están implicadas en la oxidación biológica y el metabolismo fisiológico de carbohidratos, grasas y proteínas del cuerpo, promoviendo así el metabolismo energético y la formación. En aplicaciones clínicas, estas vitaminas pueden usarse para ayudar a tratar los síntomas y las causas de enfermedades relacionadas con el metabolismo, tales como mejorar la regulación del azúcar en sangre y promover el metabolismo de las grasas. En vista de esto, puede observarse que los fármacos vitamínicos tienen un valor clínico extremadamente alto, y desempeñan un papel extremadamente importante en la prevención y el tratamiento de enfermedades del metabolismo energético, la regulación del sistema nervioso e incluso retrasar la aparición de EA. En combinación con la aplicación clínica y los resultados básicos de investigación, los fármacos vitamínicos no tienen duda de tener un valor potencial en el tratamiento del metabolismo energético y la EA. El estudio sobre vitaminas para la regulación del metabolismo energético en el cerebro para prevenir y reducir la aparición de EA tiene implicaciones sociales y clínicas.

Actualmente, un estudio clínico en fase 3 (NCT00235716) mostró que la vitamina E para la ingesta a largo plazo (6-48 meses) puede mejorar eficazmente la función cognitiva en pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL). Otro estudio clínico en fase 2 (NCT01320527) también mostró que las multivitaminas (B9, B12, E y otros nutrientes) también eran beneficiosas para la regulación cognitiva y del estado de ánimo en pacientes con DCL, lo que sugiere que el tratamiento con vitaminas en la etapa temprana del deterioro cognitivo tiene cierto efecto terapéutico sobre la EA.

- Philip Scheltens et al. en Journal of Alzheimer's Disease, vol. 31, no. 1, 5 de julio de 2012 y en Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association, vol. 6, no. 1, 1 de enero de 2010, estudio de la eficacia de souvenaid en la EA leve. La composición de souvenaid incluye EPA, DHA, fosfolípidos, colina, UMP, vitamina E, vitamina C, selenio, vitamina B12, vitamina B6 y ácido fólico. Yu et al. en el Journal of Alzheimer's Disease, vol. 54, no. 1, 4 de agosto de 2016, estudian los efectos neuroprotectores de un suplemento multivitamínico B (vitamina B6, B12, folato y colina) contra la hipoxia en el cerebro de ratones. David O Kennedy et al. en Psychopharmacology, vol. 211, no. 1, 8 de mayo de 2010, describen comprimidos multivitamínicos/minerales que contienen B1, B2, B6, B12, C, biotina, ácido fólico, nicotinamida y ácido pantoténico y minerales calcio, magnesio y cinc sobre el estado de ánimo subjetivo y el rendimiento en hombres sanos.
- En resumen, estudios básicos y clínicos han mostrado que: 1, las vitaminas B (B1, B2, B3, B5, B6, B7 y B12), 2, las vitaminas liposolubles (D, E, K) y 3, el o los microelementos (iones magnesio) tienen todos los efectos de regular el metabolismo y participar en la protección de la función neurológica, y el tratamiento temprano con vitaminas también fue beneficioso para la mejora de la EA. Sin embargo, hasta ahora no se ha usado ningún fármaco vitamínico en clínica para tratar la EA.
- Actualmente, los fármacos usados para el tratamiento de la EA son principalmente inhibidores de la acetilcolinesterasa y antagonistas de los receptores de NMDA. Los fármacos anteriores inhiben la disminución de la función cognitiva cambiando los niveles de neurotransmisores en el cerebro, pero se sabía que estos fármacos sólo pueden retrasar la progresión empeorada de los síntomas en 6-12 meses.
- La invención prepara un fármaco multivitamínico que comprende algunos o todos los elementos anteriores, y tiene como objetivo mejorar y prevenir la EA regulando e interviniendo el metabolismo energético en el cerebro en una etapa temprana. El fármaco metabolizante de energía de la presente invención intenta mejorar la función nerviosa y cognitiva mejorando el metabolismo energético en el cerebro desde la raíz, y su mecanismo de acción es diferente de los fármacos tradicionales de mejora de neurotransmisores, y tiene ventajas obvias. Los fármacos tradicionales solo pueden curar los síntomas, pero no la enfermedad. Al mismo tiempo, el fármaco descrito por la invención es relativamente seguro, y no tiene efectos secundarios obvios sobre el cuerpo mientras mejora el metabolismo energético en el cerebro, y puede considerarse como un método de tratamiento suave. Por lo tanto, el fármaco de metabolismo energético de la presente invención puede desempeñar un papel importante en el tratamiento de la EA, proporcionando un fármaco innovador para el tratamiento de la EA.
- La enfermedad de Alzheimer se ha convertido en un reto global, conllevando enormes cargas económicas a las familias y a la sociedad en el siglo 21. De acuerdo con los informes, las pérdidas económicas causadas por la enfermedad de Alzheimer en los Estados Unidos en 2016 fue de aproximadamente 236.000 millones de dólares. Actualmente, los fármacos usados para el tratamiento de la EA son principalmente inhibidores de la acetilcolinesterasa y antagonistas de los receptores de NMDA. Los fármacos anteriores inhiben la disminución de la función cognitiva cambiando los niveles de neurotransmisores en el cerebro, pero se sabía que estos fármacos sólo podían retrasar el empeoramiento de los síntomas 6-12 meses. Y estos fármacos no pueden bloquear completamente el progreso de la EA, que es el mayor problema del tratamiento de la EA. El fármaco de metabolismo energético implicado en la presente invención es un nuevo fármaco para el tratamiento de la EA. En experimentos con animales, se encontró que el fármaco puede mejorar eficazmente el nivel cognitivo de los animales, y el mecanismo puede estar relacionado con el metabolismo energético, que es completamente diferente del fármaco actual en el mercado. Se espera que después de que el fármaco se apruebe, el fármaco pueda cubrir un gran número de pacientes con EA, y la perspectiva del mercado será amplia.

Descripción de la invención

A. Sumario de la invención

- La presente invención se refiere a una composición de vitaminas, particularmente, una composición de multivitaminas B, C como se define en las reivindicaciones adjuntas para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer promoviendo el metabolismo energético. La composición es adecuada para prevenir, tratar o retrasar la enfermedad de Alzheimer, mejorar la capacidad de aprendizaje y de memoria y la disfunción cognitiva. En una realización preferida, la composición que comprende la composición de vitaminas B y la composición de vitamina C es una composición que comprende vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina), vitamina B5 (ácido pantoténico), vitamina B6, vitamina B12, vitamina B7 (biotina), vitamina B9 (ácido fólico), vitamina C, bitartrato de colina, inositol y ácido p-aminobenzoico.

- En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad eficaz de una combinación de composición de vitaminas B y composición de vitamina C como se define en las reivindicaciones adjuntas, y una cantidad eficaz de fármaco(s) para prevenir, tratar o retrasar la enfermedad de Alzheimer. En una realización preferida, la composición comprende una cantidad eficaz de vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina), vitamina B5 (ácido pantoténico), vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico, biotina, vitamina C, bitartrato de colina, inositol, ácido p-aminobenzoico y una cantidad eficaz de fármaco(s) para prevenir, tratar o retrasar la enfermedad de Alzheimer.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad eficaz de una combinación de una composición de vitaminas B y una composición de vitamina C como se define en las reivindicaciones adjuntas, y una cantidad eficaz de otros compuestos vitamínicos para su uso en la prevención, el tratamiento o el retraso de la enfermedad de Alzheimer. En una realización preferida, la composición comprende una cantidad eficaz de vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina), vitamina B5 (ácido pantoténico), vitamina B6, vitamina B12, vitamina B9 (ácido fólico), vitamina B7 (biotina), vitamina C, bitartrato de colina, inositol, ácido p-aminobenzoico y una cantidad eficaz de otros compuestos vitamínicos. Los otros compuestos vitamínicos incluyen compuestos de vitamina A, vitamina D, vitamina E, vitamina K y similares.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad eficaz de una combinación de una composición de vitaminas B y una composición de vitamina C como se define en las reivindicaciones adjuntas, y una cantidad eficaz de microelemento(s). En una realización preferida, la composición comprende una cantidad eficaz de vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina), vitamina B5 (ácido pantoténico), vitamina B6, vitamina B12, vitamina B9 (ácido fólico), vitamina B7 (biotina), bitartrato de colina, inositol, ácido p-aminobenzoico y una cantidad eficaz de microelementos. Los microelementos incluyen hierro, magnesio, cinc y similares.

La forma de dosificación de la composición que comprende la composición de vitaminas B y la composición de vitamina C de la presente invención puede ser, pero no se limita a, un comprimido masticable; también se pueden añadir a la composición de la presente invención diversos adyuvantes convencionales requeridos para preparar diferentes formas de dosificación, tales como disgregantes, lubricantes, aglutinantes, antioxidantes, agentes complejantes y otros vehículos farmacéuticos para preparar mediante métodos de preparación convencionales cualquiera de las formas de dosificación orales comúnmente usadas, tales como comprimidos dispersables, gránulos, cápsulas, líquidos orales y otras formas de dosificación.

La relación en peso de cada componente para la composición que comprende la composición de vitaminas B y la composición de vitamina C en la presente invención puede tener una pluralidad de selecciones, todas las cuales pueden promover el metabolismo energético y usarse para prevenir, tratar o retrasar la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, puede incluir los siguientes componentes basados en la relación en peso: 30-300 partes de vitamina B1, 30-300 partes de vitamina B2, 30-300 partes de vitamina B3, 30-300 partes de vitamina B5, 30-300 partes de vitamina B6, 0,01-1 partes de vitamina B7 (biotina), 0,01-2 partes de vitamina B9 (ácido fólico), 0,01-1 partes de vitamina B12 y 50-500 partes de vitamina C. En una realización preferida, la composición de vitaminas B comprende los siguientes componentes basados en la relación en peso: 100 partes de vitamina B1, 100 partes de vitamina B2, 100 partes de vitamina B3, 100 partes de vitamina B5, 100 partes de vitamina B6, 0,1 partes de biotina, 0,4 partes de ácido fólico, 0,1 partes de vitamina B12 y 150 partes de vitamina C. En una realización preferida, la composición de vitaminas B comprende los siguientes componentes basados en la relación en peso: 10 partes de vitamina B1, 15 partes de vitamina B2, 25 partes de vitamina B3, 110 partes de vitamina B5, 10 partes de vitamina B6, 0,1 partes de biotina y 150 partes de vitamina C. En una realización más preferida, la composición de vitaminas B comprende los siguientes componentes basados en la relación en peso: 10 partes de vitamina B1, 15 partes de vitamina B2, 25 partes de vitamina B3, 110 partes de vitamina B5, 10 partes de vitamina B6, 0,1 partes de biotina, 0,4 partes de ácido fólico, 250 partes de bitartrato de colina, 250 partes de inositol y 150 partes de vitamina C. En una realización más preferida, la composición de vitaminas B comprende los siguientes componentes basados en la relación en peso: 10 partes de vitamina B1, 15 partes de vitamina B2, 25 partes de vitamina B3, 110 partes de vitamina B5, 10 partes de vitamina B6, 0,1 partes de biotina, 0,4 partes de ácido fólico, 250 partes de bitartrato de colina, 0,025 partes de vitamina B12 y 150 partes de vitamina C. En otra realización más preferida, la composición de vitaminas B comprende los siguientes componentes basados en la relación en peso: 10 partes de vitamina B1, 15 partes de vitamina B2, 25 partes de vitamina B3, 110 partes de vitamina B5, 10 partes de vitamina B6, 0,1 partes de biotina, 0,4 partes de ácido fólico, 250 partes de bitartrato de colina, 250 partes de inositol, 0,025 partes de vitamina B12, 50 partes de ácido p-aminobenzoico y 150 partes de vitamina C.

B. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Si una definición expuesta en esta sección es contraria o de otro modo inconsistente con una definición expuesta en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones, la definición expuesta en esta sección prevalece sobre la definición expuesta en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones.

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el(la)" significan "al menos uno(a)" o "uno(a) o más" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término "parte", en particular, con referencia a una cantidad dada, se refiere a una cantidad con una desviación positiva o negativa dentro del 10%.

Como se usa en el presente documento, los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "contiene", "que contiene" y cualquier variación de los mismos, pretenden cubrir una inclusión no exclusiva, de modo que un proceso, método, producto por proceso o composición de materia que comprende, incluye o contiene un

elemento o lista de elementos no incluye solo esos elementos sino que puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a dicho proceso, método, producto por proceso o composición de materia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "composición de vitaminas B" incluye todos los tipos de vitamina B, por ejemplo, vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (ácido nicotínico), vitamina B5 (ácido pantoténico), vitamina B6 y así sucesivamente.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Latencia a la plataforma en el ensayo de adquisición (D1-D5) en cada grupo de animales.

Figura 2: El tiempo de retención de cada grupo de animales en el cuadrante diana (1 es el cuadrante diana).

Figura 3: Distancia de natación de cada grupo de animales en el cuadrante objetivo (1 es el cuadrante diana).

Figura 4: La actividad de enzimas de la corteza cerebral relacionadas con el metabolismo energético.

Figura 5: La expresión génica de la enzima de la corteza cerebral relacionada con el metabolismo energético.

Descripción detallada

Ejemplo 1: Efecto terapéutico del compuesto multivitamínico en ratas con EA inducida por ICV-STZ

1. Propósito del estudio

El propósito de este estudio fue evaluar la relación entre la enfermedad de Alzheimer y el metabolismo energético en el cerebro, y además evaluar si el compuesto vitamínico puede desempeñar un papel en la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer regulando el metabolismo energético en el cerebro.

2. Materiales experimentales

2.1 Reactivos

Estreptozotocina, comprimidos de vitaminas BC (ZENSUN) que contienen componentes con la siguientes relaciones en peso: 100 partes de vitamina B1, 100 partes de vitamina B2, 100 partes de vitamina B3, 100 partes de vitamina B5, 100 partes de vitamina B6, 0,1 partes de vitamina B7, 0,4 partes de vitamina B9, 0,1 partes de vitamina B12, 150 partes de vitamina C, magnesio líquido, vitaminas (D, E, K). Hidrato de cloral. Kit de actividad enzimática mitocondrial de Solarbio (número de artículo de PDH:MS2103, número de artículo de α -KGDH: MS2100, ICDHm: MS2104, SDH: MS2102), TAKARA SYBR II, kit de aislamiento de ARN total (TIANGEN), Kit RT-PCR (TOYOBO), cebadores (sintetizados por Sangon Biotech).

2.2 Instrumentos y equipos experimentales

1. Equipo de ensayo de comportamiento animal: Laberinto acuático de Morris de ratas

2. Software de registro y análisis de vídeo de comportamiento animal

3. Localizador estéreo-cerebral digital de rata/ratón

4. Bomba de inyección estereotáctica de cerebro de rata/ratón

5. Taladro craneal de rata/ratón

6. Dispositivo automatizado de homogeneización de tejidos: Shanghai Jingxin Industrial Development Co., Ltd. JXFSTPRP-24

7. Triturador ultrasónico de células: Ningbo Xinzhi Biological Technology Co., Ltd. JY92-IIDN

8. Baño de agua termostático: Shanghai Pingxuan Scientific Instrument Co., Ltd. DK-8D

9. Centrífuga de sobremesa: Thermo Scientific FRESCO 17

10. Lector de microplacas para ELISA: Molecular Devices SpectraMax M2

11. Instrumento de PCR: Sistema termociclador Block 5020 en tiempo real BIORAD CFX-Connect TM.

2.2 Animales experimentales

Ratas Wistar macho (250-320 g)

3. Diseño y métodos experimentales

3.1 Inyección intraventricular de estreptozotocina en ratas - Preparación del modelo de EA (metabolismo anormal inducido de la glucosa en el cerebro)

Este modelo fue un modelo animal de EA que simula la EA esporádica (EAS) (modelo lcv-STZ), el trastorno del metabolismo de la glucosa/energía intracerebral causado por la inyección de estreptozotocina (STZ) a través del ventrículo lateral y mimetizó con éxito diversas manifestaciones patológicas de la EAS, tales como el estrés oxidativo, la activación de respuestas inflamatorias, las anomalías en la ruta colinérgica, la hiperfosforilación de tau y la agregación de A β , el aprendizaje y la disfunción de la memoria. El modelo necesita un tiempo corto y hubo alguna disfunción cognitiva y características patológicas de la EA en unas pocas semanas. Fue un método relativamente fácil y rápido para construir el modelo de EA, que supera el coste temporal del ratón transgénico triple APPIPS1/tauP301L con modelo de EA. Por lo tanto, este proyecto pretende criar los modelos animales transgénicos triples mientras se construye el modelo lcv-STZ, y verificar los efectos de las vitaminas sobre el metabolismo energético, la prevención y el tratamiento de la EA mediante los mismos métodos de tratamiento y detección. Se espera demostrar repetidamente la eficacia de las vitaminas a través de diferentes modelos.

El modelo lcv-STZ se construyó como se indica a continuación: Se anestesiaron ratas Wistar (250-320 g), se fijaron en el localizador digital estereotaxico-cerebral, se depiló la parte superior de la cabeza y se desinfectó la piel. Se realizó la incisión media en la parte superior de la cabeza, expuesta al hueso anterior, se realizó la inyección mediante un microinyector a 0,9 mm detrás del bregma, 1,5 mm a los lados izquierdo y derecho de la línea media, 3,6 mm verticalmente desde la superficie. Se inyectaron lentamente 5 μ L de STZ (3 mg/kg) en los ventrículos izquierdo y derecho, el tiempo de inyección fue de 8 min, y la aguja se dejó durante 2 min, después se retiró lentamente. Todas las operaciones se realizaron en condiciones estériles. La incisión en la piel se esterilizó con penicilina. Se cosió la herida. El grupo simulado recibió una inyección de igual volumen de solución salina normal.

3.2 Agrupamiento y administración de ratas modelo lcv-STZ

Después de establecer el modelo lcv-STZ, las ratas se cultivaron durante una semana, y después se administró el fármaco por vía intragástrica durante un período de 2 meses. Los animales experimentales se dividieron en 4 grupos: grupo de control normal, grupo modelo, grupo de tratamiento y grupo de fármaco positivo, cada grupo tenía 20 animales. Los grupos específicos se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 1. Grupos de ratas modelo lcv-STZ (n = 20/grupo)

Grupos	Terapia farmacológica
Control normal (inyección de solución salina-lcv)	Vehículo
Modelo (inyección lcv-STZ)	Vehículo
Vitamina (inyección lcv-STZ)	Multivitaminas
Fármaco positivo (inyección lcv-STZ)	Donepezilo

3.3 Verificación del modelo animal lcv-STZ

Para confirmar la estabilidad y fiabilidad del modelo lcv-STZ de rata, al mismo tiempo que el experimento de administración formal, se establecieron otros dos grupos como el grupo de control normal (solución salina lcv) y el grupo modelo (inyección lcv-STZ), cada grupo tenía 20 animales. Se realizaron ensayos conductuales 1 mes y 2 meses después de la finalización del modelado.

I. Conversión de comprimidos de multivitaminas BC a dosis de ratón = (\div 60 kg \times 12,3 coeficiente de ratón \times 5 veces la dosis)

II. Conversión de comprimidos de multivitaminas BC en dosis de rata = (\div 60 kg \times 6,2 coeficiente de rata \times 5 veces la dosis)

III. Ratas convertidas a dosis de ratón = 1,98 \times ratón convertido en dosis de rata = 0,5 \times

IV. Conversión de la dosis subcutánea en animales a dosis de administración intragástrica = 3 \times

Tabla 2. Composición de comprimidos de multivitaminas BC y dosificación

Componente	Dosis de administración en ratas mg/kg (administración intragástrica/día)
Vitamina B1	10,28

Vitamina B2	10,28
Vitamina B3	10,28
Vitamina B5	10,28
Vitamina B6	10,28
Vitamina B7	0,0103
Vitamina B9	0,0411
Vitamina B12	0,0103
Vitamina C	15,425

3.4 Preparación de reactivos

- 5 a) Solución de CMC-Na al 0,5%: Se pesaron 2,0 g de polvo de CMC-Na y se añadieron lentamente 300 mL de agua ultrapura a la misma; la mezcla se sometió a agitación magnética hasta que se disolvió completamente para alcanzar un volumen constante de 400 mL, preparando de este modo una solución transparente del 0,5%, que se almacenó a 4 °C para su uso posterior.

Dosis de administración de comprimidos de multivitaminas BC:

- 10 Dosis de ratón: $1 \text{ pieza de comprimidos de multivitaminas BC} \div 60 \text{ kg} \times 12,3 \text{ coeficiente de ratón} \times 5 \text{ veces la dosis} = 1,025 \text{ pieza/kg}$
- 10 Dosis en ratas: $1 \text{ pieza de comprimidos de multivitaminas BC} \div 60 \text{ kg} \times 6,2 \text{ coeficiente de rata} \times 5 \text{ veces la dosis} = 0,516 \text{ pieza/kg}$

- 15 b) Preparación de suspensión de comprimidos de multivitaminas BC: Después de moler los comprimidos de multivitaminas BC apropiados, se añadió CMC-Na al 0,5% a los mismos, y la mezcla se sometió a oscilación para volverse homogénea, formando de este modo una suspensión estable. 1,025 piezas/kg por ratón y 0,516 piezas/kg por rata. Los fármacos se administraron una vez por la mañana y una vez por la noche.

Dosis de fármaco de control positivo - hidrocloreuro de donepezilo:

Dosis de ratón: Dosis clínica (5 mg/d) $\div 60 \text{ kg} \times 12,3 \text{ coeficiente de ratón} = 1,025 \text{ mg/kg}$

Dosis de rata: Dosis clínica (5 mg/d) $\div 60 \text{ kg} \times 6,2 \text{ coeficiente de rata} = 0,516 \text{ mg/kg}$

- 20 c) Solución de hidrocloreuro de donepezilo: Se añadió polvo pesado de hidrocloreuro de donepezilo apropiado, CMC-Na al 0,5%, y la mezcla se sometió a oscilación para volverse homogénea, formando de ese modo una suspensión estable. Se administró hidrocloreuro de donepezilo como se indica a continuación: 1,025 mg/kg (ratón) y 0,516 mg/kg (rata). Se administró a los animales dos veces al día, solución de hidrocloreuro de donepezilo por la mañana, volumen igual de CMC-Na al 0,5% y solución de multivitaminas BC por la tarde.

3.5 Método de administración

- 25 Los volúmenes de administración intragástrica en ratón y ratas fueron de 20 mL/kg y 10 mL/kg, respectivamente. Al grupo de control normal y al grupo modelo se les administró un volumen correspondiente de solución de adyuvante de comprimidos de vitaminas BC y CMC-Na al 0,5% en peso.

3.6 Ensayos de comportamiento

Laberinto acuático de Morris

- 30 El laberinto acuático de Morris se usó como un ensayo conductual para estudiar el aprendizaje espacial y la memoria. Los roedores tuvieron una fuerte motivación para escapar del agua, intentaron escapar del entorno del agua. El proceso de aprendizaje para escapar del entorno acuático refleja la capacidad de aprendizaje de los animales. Se localiza espacialmente el lugar seguro (plataforma) en el agua de acuerdo con el entorno circundante, y se nada a la plataforma a propósito, lo que podría reflejar la capacidad de memoria de referencia espacial de los animales.
- 35 El sistema experimental de Morris consiste en un dispositivo de laberinto acuático, una adquisición automática de imágenes y un sistema de análisis de software. La unidad de laberinto acuático de Morris consiste principalmente en una piscina y una plataforma con una altura ajustable y una posición móvil.

El experimento de laberinto acuático tuvo dos partes:

1) Fase de adquisición

La agrupación se dividió en cuatro cuadrantes, y la plataforma se colocó en un cuadrante con el nivel de líquido por encima de 1 cm de la plataforma. Los animales se colocaron hacia la pared de la piscina en el agua, y la posición se tomó aleatoriamente en una de las cuatro posiciones iniciales en diferentes direcciones. Se registró el tiempo para que los animales encontraran y subieran a la plataforma (latencia de escape) para ensayar la capacidad de aprendizaje de los animales. Si un animal no había encontrado la plataforma durante más de 60 s, necesitaba ser guiado a la plataforma. Los animales se dejaron reposar sobre la plataforma durante 10 s, después se retiraron, se secaron con luz infrarroja lejana y se devolvieron a la jaula hasta la siguiente ronda de experimentos. Cada animal se entrenó 4 veces al día durante 5 días (o más, dependiendo de la situación de aprendizaje del modelo, y se consideró que una latencia promedio del modelo < 20 s era exitosa).

2) Entrenamiento de exploración

El entrenamiento de exploración se realizó 1,5 horas y 1 día después de la fase de adquisición. La plataforma se retiró antes del experimento, los ratones se colocaron en el agua en el lado opuesto del cuadrante de la plataforma original, y se comenzó a registrar 60 s. El índice de detección de memoria espacial incluyó: 1) el tiempo en que el animal cruzó la plataforma por primera vez, 2) el tiempo en que el animal consumió en el cuadrante diana (el cuadrante en el que se colocó originalmente la plataforma); 3) cuántas veces entró el animal en el cuadrante diana.

3.7 Ensayo de actividad enzimática mitocondrial

1) Muestreo de tejido cerebral

Se extrajo rápidamente tejido cerebral de ratas anestesiadas profundamente con hidrato de cloral al 10%, después de decapitar las ratas. La corteza cerebral se puso en un tubo de centrifuga de 2 mL limpio y preenfriado, se pesó rápidamente y se puso en nitrógeno líquido para su congelación rápida, luego se recogieron uniformemente y se colocaron en el refrigerador y se almacenaron a -80 °C.

2) Extracción de enzima mitocondrial

Se usó en el experimento el kit de detección de la actividad enzimática mitocondrial de Solarbio. Se pesaron aproximadamente 0,1 g de corteza cerebral, se añadieron 1 mL de reactivo 1 y 10 µL de reactivo 3 a la corteza cerebral anterior y se trituraron con baño de hielo. El precipitado se retiró por centrifugación a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo centrifugo, el sobrenadante se retiró por centrifugación a 4 °C. Se añadieron 200 µL de reactivo 2 y 2 µL de reactivo 3 al precipitado, disrupción ultrasónica, después se usó en el ensayo de detección de actividad enzimática.

3.8 Detección de ARNm relacionado con el metabolismo energético

1) Muestreo del tejido cerebral

Se extrajo rápidamente tejido cerebral de ratas anestesiadas profundamente con hidrato de cloral al 10%, después de decapitar las ratas. La corteza cerebral se puso en un tubo de centrifuga de 2 mL limpio y preenfriado, se pesó rápidamente y se puso en nitrógeno líquido para su congelación rápida, luego se recogieron uniformemente y se colocaron en el refrigerador y se almacenaron a -80 °C.

2) Expresión de ARNm

En el experimento se usó el kit de extracción de ARN total TIANGEN. Se pesaron aproximadamente 0,1 g de corteza cerebral, se añadió 1 mL de lisado RZ a la corteza cerebral anterior, y después se homogenizó la muestra. Se dejó aparte durante 5 minutos, se añadieron al precipitado 200 µL de cloroformo, se hizo oscilar violentamente durante 15 s, se dejó aparte durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 4 °C. La fase acuosa se movió a un nuevo tubo, se añadió 0,5 veces el volumen de alcohol absoluto al tubo y se mezcló homogéneamente. Se transfirió a la columna de absorción CR3, el residuo líquido se separó por centrifugación a 4 °C. Se añadió solución de eliminación de proteínas, el residuo líquido se separó por centrifugación. Se enjuagó dos veces con tampón de enjuagado, el residuo líquido se separó por centrifugación. Se almacenó a temperatura ambiente durante 2 minutos después de añadir 30-100 µL de ddH₂O libre de RNasa, se centrifugó a 4 °C. La expresión de ARNm se detectó mediante PCR en tiempo real después de la transcripción inversa mediante el kit RT-PCR de TOYOBO.

4. Resultados

En la fase de adquisición del laberinto acuático de Morris (D1-D5), se tomó el tiempo que tardan los animales en encontrar la plataforma oculta como índice de detección de memoria espacial. Cuanto más corta sea la latencia a la plataforma, mejor será la memoria. Como se muestra en la figura 1, la latencia a la plataforma de cada animal del grupo se acorta significativamente a medida que aumenta el tiempo de entrenamiento. Ello sugirió que las habilidades de aprendizaje y memoria mejoraron con el entrenamiento repetido. La capacidad de aprendizaje y memoria de los animales modelo de D1 a D5 fue significativamente peor que la de los animales de control normales. Las capacidades

de aprendizaje y memoria de los animales modelo mejoraron significativamente después del tratamiento con el fármaco de metabolización de energía (composición de multivitaminas BC), lo que indica que la composición de multivitaminas BC podría mejorar significativamente la capacidad de aprendizaje y memoria de los animales con demencia.

- 5 En el entrenamiento de exploración, los animales se colocaron en el agua en el lado opuesto del cuadrante original de la plataforma. El tiempo que el animal pasó en el cuadrante diana (el cuadrante en el que se colocó originalmente la plataforma oculta) y las distancias de natación se registraron como el índice de ensayo de la memoria espacial. Cuanto mejor sea la capacidad de memoria del animal, mayor será el tiempo en el cuadrante diana y mayor será la distancia de natación. Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3. El tiempo y la distancia de natación de los animales normales de control en el cuadrante diana - cuadrante 1 (el cuadrante original de la plataforma oculta) fueron significativamente mayores que en otro grupo, lo que indica que su nivel de memoria fue el mejor. El tiempo y la distancia de natación de los animales del grupo de vitaminas BC en el cuadrante diana fueron mayores que el grupo modelo. Además, sugería que la terapia con VBC durante 2 meses podría mejorar eficazmente la capacidad de memoria de animales con demencia.
- 10
- 15 Los resultados del ensayo de detección de la actividad enzimática mitocondrial se muestran en la figura 4. La composición de multivitaminas BC mejoró significativamente la actividad de las enzimas clave (piruvato deshidrogenasa (PDH), alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa mitocondrial (ICDHm) y succinato deshidrogenasa (SDH)) implicadas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos en la corteza cerebral, mejorando así la actividad del metabolismo mitocondrial.
- 20 Los resultados del ensayo de ARNm relacionado con el metabolismo energético mostraron que las expresiones de los genes SDHA y ATP5B en la corteza cerebral de los animales modelo eran menores que las del grupo normal, como se muestra en la figura 5. La composición de multivitaminas BC y la terapia de combinación aumentaron la expresión de SDHA y ATP5B, mejoraron el metabolismo mitocondrial y mejoraron la función cognitiva.

5. Conclusión

- 25 La capacidad de aprendizaje y memoria de las ratas modelo ICV-STZ disminuyó significativamente en el experimento del laberinto acuático de Morris. La capacidad de aprendizaje y memoria de las ratas mejoró significativamente después de la terapia con el compuesto multivitaminas BC durante 2 meses. La actividad de las enzimas clave implicadas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos aumentó y el nivel de expresión del ARNm relacionado con el metabolismo energético mejoró en la corteza cerebral. Esto indicó que este fármaco tiene cierto efecto terapéutico sobre el tratamiento de la disfunción cognitiva de la EA, y se espera que proporcione una nueva clase de fármacos para pacientes con EA.
- 30

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vitaminas para su uso en un método para prevenir, tratar o retrasar la enfermedad de Alzheimer, en donde la composición comprende vitamina B1 que se refiere a tiamina;
vitamina B2 que se refiere a riboflavina;
5 vitamina B3 que se refiere al ácido nicotínico;
vitamina B5 que se refiere al ácido pantoténico; vitamina B6 que se refiere a la piridoxina; vitamina B7 que se refiere a la biotina; vitamina B9 que se refiere al ácido fólico;
vitamina B12 que se refiere a cianocobalamina; y vitamina C que se refiere a ácido ascórbico.
- 10 2. La composición de vitaminas para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición de vitaminas comprende además bitartrato de colina.
3. La composición de vitaminas para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que la composición de vitaminas comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. La composición de vitaminas para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición de vitaminas comprende además una cantidad eficaz de otras vitaminas.
- 15 5. La composición de vitaminas para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición de vitaminas comprende además una cantidad eficaz de microelemento(s).
6. La composición de vitaminas para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición de vitaminas comprende los siguientes componentes basados en la relación en peso: 30-300 partes de vitamina B1, 30-300 partes de vitamina B2, 30-300 partes de vitamina B3, 30-300 partes de vitamina B5, 30-300 partes
20 de vitamina B6, 0,01-1 partes de vitamina B7, 0,01-2 partes de vitamina B9, 0,01-1 partes de vitamina B12 y 50-500 partes de vitamina C.
7. La composición de vitaminas para su uso según la reivindicación 6, en la que la composición de vitaminas comprende los siguientes componentes basados en la relación en peso: 100 partes de vitamina B1, 100 partes de vitamina B2, 100 partes de vitamina B3, 100 partes de vitamina B5, 100 partes de vitamina B6, 0,1 partes de vitamina
25 B7, 0,4 partes de vitamina B9, 0,1 partes de vitamina B12 y 150 partes de vitamina C.

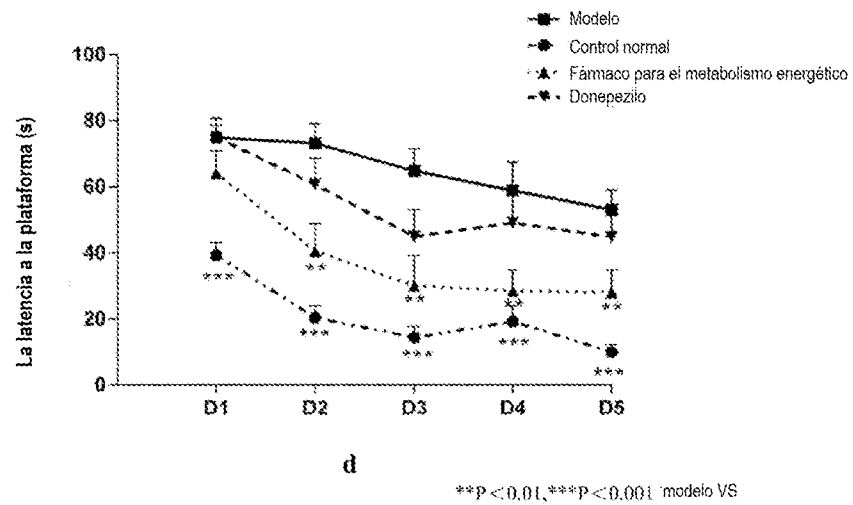


Figura 1: La latencia a la plataforma en el ensayo de adquisición (D1-D5) en cada grupo de animales

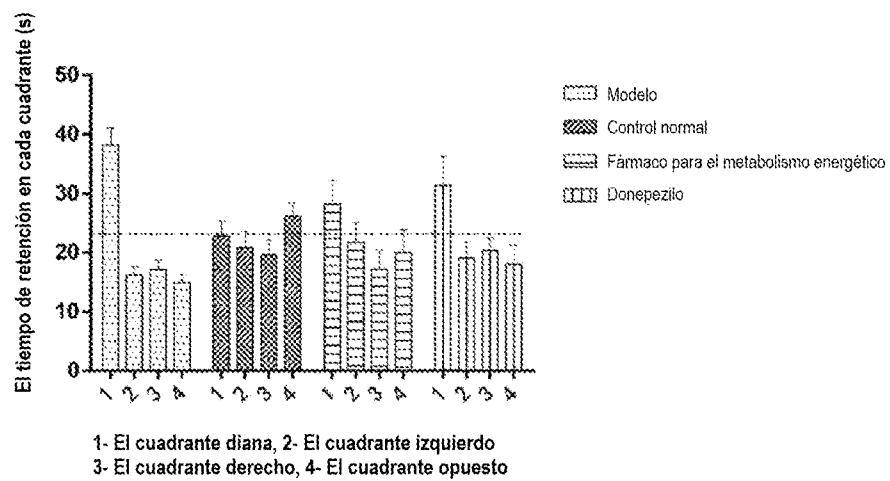


Figura 2: El tiempo de retención de cada grupo de animales en el cuadrante diana (1 es el cuadrante diana)

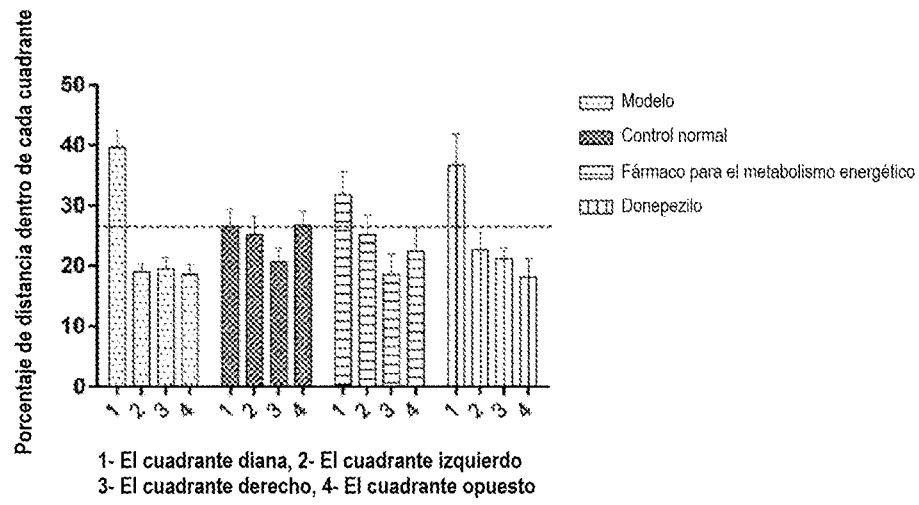


Figura 3: Distancia de natación de cada grupo de animales en el cuadrante diana (1 es el cuadrante diana)

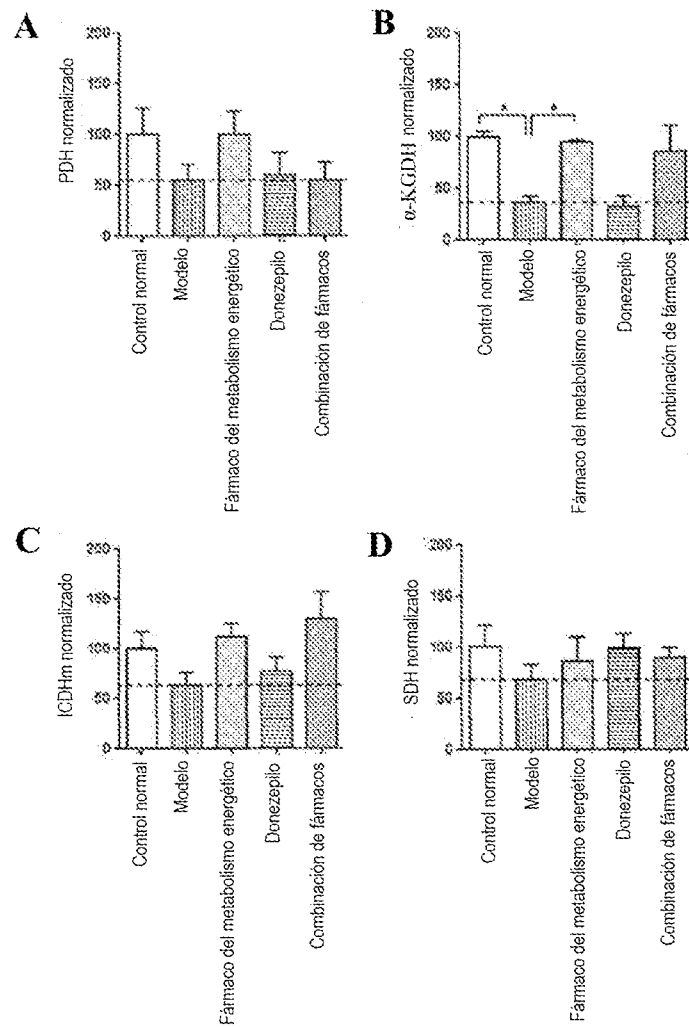


Figura 4: La actividad de enzimas de la corteza cerebral relacionadas con el metabolismo energético

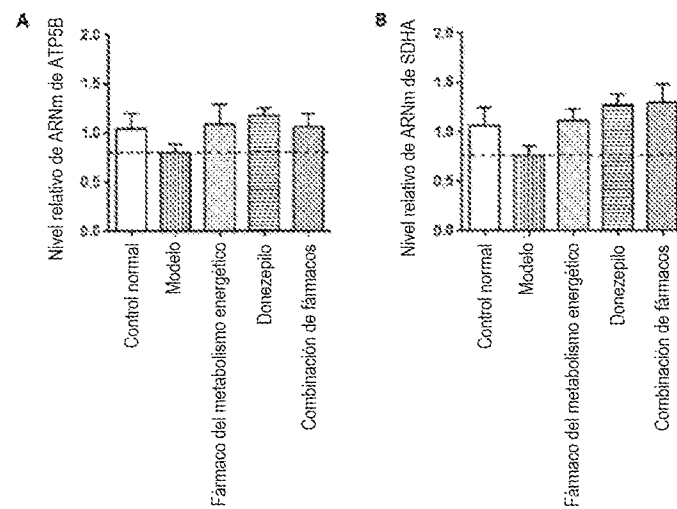


Figura 5: La expresión de genes de la enzima de la corteza cerebral relacionada con el metabolismo energético