

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391118 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.10.12

(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)

(22) Дата подачи заявки  
2021.10.07

(54) БИОФАКТОРЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ДЕМЕНЦИИ

(31) 20200644.1

(72) Изобретатель:  
Вёрваг Фриц, Вёрваг Маркус (DE)

(32) 2020.10.07

(33) EP

(74) Представитель:  
Можайский М.А. (RU)

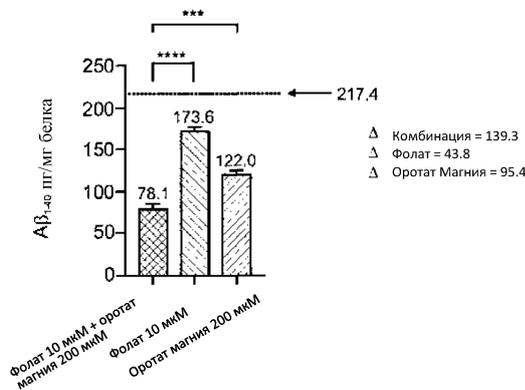
(86) PCT/EP2021/077684

(87) WO 2022/074114 2022.04.14

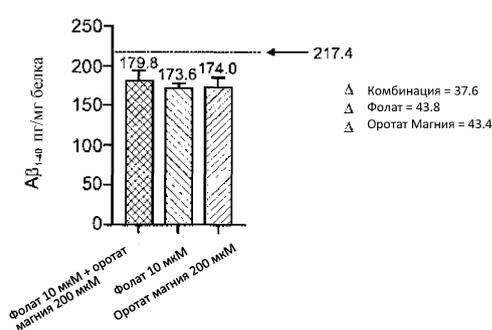
(71) Заявитель:  
ВЁРВАГ ФАРМА ГМБХ И КО. КГ  
(DE)

(57) Изобретение относится к средству, содержащему комбинацию биофакторов, по меньшей мере включающую оротат магния и фолиевую кислоту или фолаты, для лечения и профилактики деменции (как заболевания) и митохондриальной дисфункции, в частности лекарственному средству или биологически активной добавке, и его применению.

Фолат 10 мкМ + оротат магния 200 мкМ



Фолат 10 мкМ + оротат магния 200 мкМ



202391118

A1

A1

202391118

## БИОФАКТОРЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ДЕМЕНЦИИ

### Описание

Изобретение относится к средству для лечения и профилактики деменции (как заболевания) и митохондриальной дисфункции, в частности лекарственному средству или биологически активной добавке, содержащим комбинацию биофакторов, и его применению.

Деменция классифицируется Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в главе V «Психические и поведенческие расстройства» МКБ-10 (Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-я редакция (2019 г.)) как F00-F03, и является синдромом, обусловленный заболеванием головного мозга, обычно хронического или прогрессирующего характера, при котором происходит нарушение нескольких высших корковых функций, включая память, мышление, ориентацию, понимание, счет, способность к обучению, речь и способность рассуждать. Сознание при этом не затуманено. Ухудшение эмоционального контроля, социального поведения или мотивации обычно сопровождается, а иногда и предваряется, нарушениями когнитивной функции. Этот синдром возникает при болезни Альцгеймера, при цереброваскулярных заболеваниях и в других условиях, первично (прямо) или вторично (косвенно) влияя на мозг (см. также «Деменция: Приоритет Общественного Здравоохранения» (2012) (<https://www.alz.co.uk/WHO-dementia-report>)).

Деменция Альцгеймера (ДА) является наиболее распространенной формой деменции во всем мире, и сегодня ею страдает более 60% людей с деменцией. Основной патологической характеристикой ДА является образование сенильных или амилоидных бляшек, состоящих из Аβ-пептида, и нейрофибриллярных клубков, сопровождающееся синаптической дегенерацией и нейродегенерацией и глиозом, при этом гиперфосфорилированный тау-белок связывается с микротрубочками (МАРТ). Аβ-пептид возникает в результате активности по меньшей мере двух различных протеаз из белка-предшественника, а именно «белка-предшественника амилоида» (APP), который расположен в клеточной стенке нейронов. При протеолитическом расщеплении APP и последующей модификации образуются Аβ-фрагменты разной длины и типа. Отложение Аβ в виде бляшек до сих пор считается по меньшей мере одним из факторов, вызывающих симптомы заболевания. При сосудистой деменции нарушения кровообращения в головном мозге приводят к гибели нейронов. Эти расстройства могут быть, например, результатом множественных незначительных инсультов (например, из-за окклюзии

сосудов), и могут также возникать отсроченно (так называемая «мультиинфарктная деменция»).

До настоящего времени можно было в лучшем случае лечить симптомы деменции, такой как ДА, которые возникают в результате гибели нейронов и определяют степень деменции, но не её причину.

На сегодняшний день не известно ни одного одобренного лекарства, которое могло бы вылечить патологические процессы при (первичной) деменции, вызванной заболеванием головного мозга.

Однако прогрессирование заболевания или даже начало деменции можно отсрочить или оказать на него положительное влияние. Помимо снижения индивидуального риска (например, предотвращения избыточного веса (ожирения), малоподвижного образа жизни, курения, употребления алкоголя, негативного стресса и т. д.), значительный вклад могут внести биофакторы, такие как витамины и т.п., при условии проведения длительного и непрерывного лечения или профилактики. Это и является предметом исследования Заявителя.

ДА является многофакторным заболеванием, при котором все более значимой становится роль метаболических и воспалительных сопутствующих заболеваний. Только около 2% случаев ДА вызваны соматическими мутациями в белке-предшественнике амилоида (APP), пресенилине 1 (PSEN1) и пресенилине 2 (PSEN2) (семейная ДА, fAD), в то время как 98% случаев ДА имеют спорадическую (спорадическая ДА, sAD), пока неизвестную, но сложную и мультифакторную этиологию [1-3]. Полногеномные исследования ассоциаций (GWAS) ранее связывали аллели аполипопротеина E, в частности, ApoE  $\epsilon$ 4, с повышенным риском развития как легких когнитивных нарушений, так и ДА [4,5]. Другие генетические факторы, которые были идентифицированы на основе GWAS и были связаны с возникновением sAD, представлены, например, аполипопротеином J (APOJ), фосфатидилинозитол-связывающим белком сборки клатрина (PICALM), запускающим рецептором, экспрессируемым на миелоидных клетках 2 (TREM2), кластером дифференцировки 33 (CD33) и рецептором комплемента 1 (CR1) [4-7]. В последнее время все более значительная роль, в частности в западных странах, отводится метаболическим сопутствующим заболеваниям ДА, обусловленным нарушением питания [8,9]. Одним из выявленных на сегодняшний день сопутствующих заболеваний sAD является диабет (типа 1 или типа 2), патологическое состояние, широко

распространенное среди групп населения в западном мире, при этом, согласно текущим оценкам, 176 миллионов человек во всем мире страдают от диабета типа 1 (~5-10% случаев), диабета типа 2 (~90% случаев) или других форм диабета, например, гестационного диабета [9,10]. Диабет 2 типа, который составляет большинство случаев диабета во всем мире, чаще встречается у пожилых людей и связан с употреблением высококалорийной низкокачественной пищи в сочетании с малоподвижным образом жизни — обстоятельств, которые преобладают среди групп населения в промышленно развитых странах Запада. Рацион в этих странах часто включает дешевые продукты с высокой степенью переработки, которые содержат значительную долю насыщенных жирных кислот, холестерина и простых углеводов и в то же время лишены необходимых минеральных веществ, микроэлементов и витаминов [11-14]; например, в западных группах населения и, в частности, среди пожилых людей, часто наблюдается хронический дефицит магния, цинка и витамина B, в частности тиамина, фолиевой кислоты или пролекарств, таких как бенфотиамин и витамин D, при этом дефицит распространяется во всех состояниях, от бессимптомных состояний, которые можно определить только в лабораторных условиях, до клинически проявляющихся дефицитов со специфическими симптомами или без них. Примечательно, что у ~80% больных ДА на фоне деменции развивается непереносимость глюкозы или диабет [15,16], что указывает на взаимосвязь [17]. Можно считать, что с этим связана митохондриальная дисфункция, которая может быть причиной или фактором, способствующим деменции.

Кроме того, западные диеты в сочетании с отсутствием физической активности часто приводят к ожирению [14], а в частности повышенная концентрация висцерального жира вызывает мета-воспаление [18] (так называемое «холодное воспаление»), которое приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  из инфильтрирующих макрофагов и гепатоцитов и, таким образом, к системному нарушению метаболизма [18,19]. И ожирение, и диабет усугубляют или «подпитывают» патологию ДА [9,11,20].

Ввиду того, что при общем старении населения увеличивается число пациентов, страдающих нарушениями обмена веществ, в том числе диабетом и ожирением (в первую очередь вызванными неполноценным питанием или его сочетанием с недостатком активности), которые являются основными факторами риска развития деменции, в частности ДА, дефицит или снижение потребления биофакторов, в частности магния,

цинка и витамина В, в частности тиамина, фолиевой кислоты или пролекарств, таких как бенфотиамин и витамин D, представляет большой риск для пожилых людей. Это связано с измененным метаболическим процессом у пожилых людей (например, мышечная атрофия и т. д.).

Ранее описаны биофакторы для лечения и профилактики деменции. Например, даже дефицит витаминов, в частности дефицит витамина В12, может вызвать (вторичную) деменцию (ВОЗ МКБ-10 (2019), F02.8).

Как указано выше, Заявитель сосредоточил внимание, в частности, на следующих соединениях или веществах, а именно на оротате магния или цинка, витамине D, в частности, витамине D3 (холекальцифероле) и витамине В, в частности, тиамине, фолиевой кислоте, витамине В6 и В12 (кобаламине) и бенфотиамине.

В частности, оротаты оказались перспективными «переносчиками» Zn и Mg, поскольку они могут легко преодолевать гематоэнцефалический барьер. Оротаты также удобны, поскольку, например, оротат магния, а также оротат цинка могут легко проходить через клеточную мембрану или пронизывать ее, а также могут предпочтительно поглощаться митохондриями и ядром [21]. Полученная в результате этого стимуляция снабжения энергией, например, образование АТФ в митохондриях, полезна, поскольку митохондриальная дисфункция может быть причиной деменции, в частности ДА, или фактором, способствующим ее развитию (см. выше).

Кроме того, ранее описаны комбинированные препараты вышеуказанных биофакторов для лечения и профилактики деменции.

Так, в US 20150132273A1 описан треонат магния в сочетании с биофакторами для лечения когнитивных нарушений. Однако треонат оказался неэффективным «переносчиком» магния или цинка, поскольку сам треонат быстро расщепляется несколькими метаболическими путями.

В WO 2017/179644 A1 описано применение солей магния, кроме оротата магния, в сочетании с биофакторами для лечения деменции.

В примере 1 WO 2017/059895 A1 раскрыт препарат, состоящий из L-5-метилтетрагидрофолата (100–800 мкг эквивалента фолиевой кислоты), витамина В3 (4–40 мг), витамина В2 (0,4–5 мг), метилкобаламина (0,5-10 мкг), витамина В6 (0,4-5 мг), триметилглицина (100-2000 мг), бисглицината цинка (5-50 мг) и N-ацетилцистеина (100-2000 мг) для лечения деменции.

У Мишулона и др. [22] для лечения деменции, включая сенильную деменцию альцгеймеровского типа, и для ее профилактики раскрыт фолат. Описано введение пациентам 15 мг в сутки.

Исходя из вышеизложенного, задача, решаемая настоящим изобретением, состоит в том, чтобы обеспечить наиболее подходящие и эффективные комбинации биофакторов для лечения и профилактики деменции, в частности, для длительной терапии или длительной профилактики.

С этой целью заявитель провел всесторонние доклинические испытания на моделях ДА, которые демонстрируют пригодность комбинаций биофакторов для профилактики и лечения деменции, в частности ДА.

Иммортиализованные клетки нейробластомы и, в частности, человеческие клетки SY-SY5Y-APP695 сверхэкспрессируют ген APP нервной системы человека, что приводит к повышенному образованию  $\beta$ -амилоида.

Нематода *C. elegans* (CL2006) экспрессирует человеческий  $\beta$ -амилоид (1-42) под контролем мышечно-специфического промотора так, что происходит прогрессивный паралич червя. Продолжительность жизни сокращается, и у червя обнаруживаются характерные отложения  $\beta$ -амилоида.

Крысы с болезнью Альцгеймера TgF344-AD были протестированы через 6-7 и 15-16 месяцев на активность окислительного фосфорилирования митохондрий по сравнению с дикими типами.

Результаты поясняются и подтверждаются примерами и чертежами.

Оказалось, что для композиции оротата магния и фолиевой кислоты в иммортиализованных клетках нейробластомы и, в частности, в клетках SY-SY5Y-APP695 человека можно достичь сверхсуммарного ингибирования  $\beta$ -амилоида (фиг. 1А).

Этот результат, в частности, также показывает, что такая комбинация подходит для нормализации образования АТФ в митохондриях и противодействия вызывающей болезнь митохондриальной дисфункции.

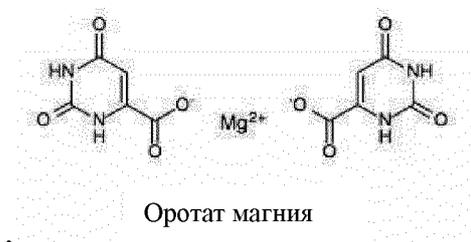
Таким образом, изобретение относится к средству, в частности лекарственному средству или пищевой добавке, или к сбалансированному рациону питания, включающему или содержащему оротат магния и фолиевую кислоту, для применения в профилактике и лечении деменции (в дальнейшем: средство по изобретению).

Ещё в одном варианте осуществления изобретение относится к средству, в частности к лекарственному средству или к диетической добавке, или к сбалансированному рациону питания, включающему или содержащему оротат магния и фолиевую кислоту, для применения в профилактике и лечении митохондриальной дисфункции, в частности, выбранной из следующей группы: сердечная недостаточность, неалкогольный гепатит, хроническая усталость или фибромиалгия (в дальнейшем: средство по изобретению).

Вышеупомянутые испытания показали, что, помимо оротата магния и фолиевой кислоты, в частности «коктейля» из оротата магния или цинка, по меньшей мере дополнительный поддерживающий эффект дают витамин D, в частности витамин D3 (холекальциферол), и витамин B, в частности тиамин, фолиевая кислота, витамины B6 и B12 (кобаламин) и бенфотиамин.

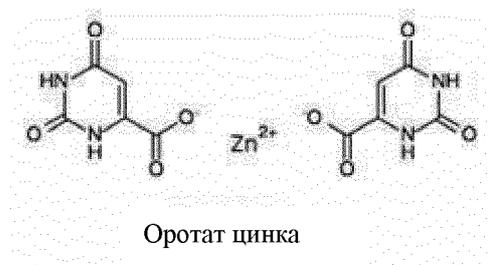
Поэтому в изобретение также включены другие комбинации, в которых по меньшей мере два, три, четыре, пять или шесть веществ или все вещества, выбраны из группы, включающей оротат магния, оротат цинка, витамин D3, витамин B6, фолиевую кислоту, витамин B12 и бенфотиамин.

Оротат магния представляет собой соль оротовой кислоты (или 6-карбоксиурацила), имеющую формулу



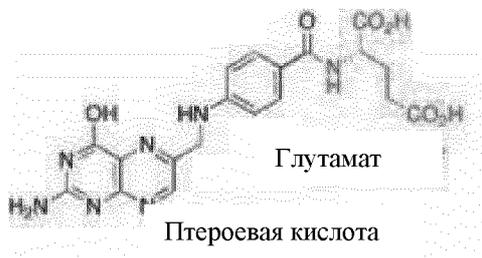
и является коммерчески доступным, например, от компании Вёрваг Фарма ГмбХ (Бёблинген, Германия).

Оротат цинка представляет собой соль оротовой кислоты (или 6-карбоксиурацила), имеющую формулу



и является коммерчески доступным, например, от компании Вёрваг Фарма ГмбХ (Бёблинген, Германия).

Фолиевая кислота (или птероилмоноглутаминовая кислота) — это витамин В9



или таутомеры (2S)-2-[(4-[(2-амино-4-оксо-1H-птеридин-6-ил)метиламино]бензоил)амино]пентандиовая кислота (лактам) или (2S)-N-(4-[(2-амино-4-гидроксиптеридин-6-ил)метил]амино)бензоил)глутаминовая кислота (лактим); может присутствовать в виде фолатов с 2-мя – 7-ью глутамильными остатками. Кроме того, фолаты могут быть гидрогенированными на птеридине, такими как 5, 6, 7, 8- тетрагидрофолат, или могут быть замещенными (например, метилфолат, такой как, к примеру, 5-метилтетрагидрофолат). В изобретении такие фолаты (или эквиваленты фолиевой кислоты) в целом называются термином «фолиевая кислота». Изобретением также охвачены таутомеры и соли фолиевой кислоты. Предпочтительной в изобретении является синтетически полученная фолиевая кислота.

Бенфотиамин представляет собой липофильное пролекарство тиамина (витамина В1) и, таким образом, является провитамином и распространяется Заявителем, например, как “milgamma protekt®” специально для лечения невропатий и сердечно-сосудистых заболеваний, вызванных дефицитом витамина В1.

Ещё в одном предпочтительном варианте осуществления средства по изобретению молярное отношение оротата магния к фолиевой кислоте предпочтительно составляет 2-25:1, в частности 20:1.

Витамины В и D относятся к коммерчески доступным витаминам D2 и D3 и от В1 до В12.

Указанные вещества могут применяться в их физиологически активных формах и могут содержать соли, кофакторы и гидраты или стереоизомеры, таутомеры (например, R, S, Z, E) и т.д.

В контексте настоящего изобретения под деменцией (заболеванием(ями)) понимают (не исчерпывающе) такие заболевания, как деменция при болезни Альцгеймера

или болезнь Альцгеймера, деменция при болезни Альцгеймера с ранним началом (тип 2), деменция при болезни Альцгеймера с поздним началом (тип 1), деменция при болезни Альцгеймера атипичная или смешанного типа, сосудистая деменция и деменция с тельцами Леви, причем все эти формы охвачены изобретением. Эти формы деменции описаны Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в главе V «Психические и поведенческие расстройства» «Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем», 10-я редакция (2019 г.) как F00-03 (см. выше).

В контексте настоящего изобретения под термином «митохондриальная дисфункция» понимают наличие дисбаланса между образованием энергии (АТФ и НАДХ) и образованием кислородных радикалов или РФК (реактивных форм кислорода) в клетке или в её митохондриях, что приводит к недостатку энергии и усиленному окислительному стрессу, а также к появлению или возможному появлению вторичных заболеваний, в частности хронических заболеваний, таких как деменция, в частности ДА, сердечная недостаточность, неалкогольный гепатит, хроническая усталость, синдром хронической усталости (СХУ) или фибромиалгия (синдром). На основе литературы приведены доказательства причинно-следственной связи между митохондриальной дисфункцией и ДА [23, 24], а также хронической усталостью, СХУ или фибромиалгией [25].

Все указанные особенности описаны в Психрембель. Клинический словарь, 267-е издание. Де Грюйтер, Берлин.

Эффективное средство, содержащее комбинацию оротата магния и фолиевой кислоты в соответствии с изобретением, теперь можно успешно использовать для лечения и профилактики больного пациента или индивидуума, животного, млекопитающего или, предпочтительно, человека, и, в частности, для лечения и профилактики деменции (как заболеваний), митохондриальной дисфункции, сердечной недостаточности, неалкогольного гепатита, хронической усталости, синдрома хронической усталости (СХУ) или фибромиалгии (синдрома).

Средство можно вводить в любых желаемых количествах и дозировках.

Галеновая рецептура средства в соответствии с изобретением может быть выбрана из группы, включающей капли, сок, сироп, таблетки, таблетки с сахарным покрытием, капсулы, составы с замедленным высвобождением, настои, мази, эмульсии или порошок. Композиция, безусловно, может содержать стандартные фармацевтические вспомогательные вещества.

Ещё в одном варианте осуществления изобретение относится к лекарственному средству, содержащему средство по изобретению для использования или применения для лечения и профилактики деменции (как заболеваний), митохондриальной дисфункции, сердечной недостаточности, неалкогольного гепатита, хронической усталости, синдрома хронической усталости (СХУ) или фибромиалгии (синдрома).

Ещё один предпочтительный вариант осуществления относится к пищевой добавке, содержащей средство по изобретению, в частности, в виде диетической композиции или сбалансированного рациона питания для лечения и профилактики деменции (как заболеваний), митохондриальной дисфункции, сердечной недостаточности, неалкогольного гепатита, хронической усталости, синдрома хронической усталости (СХУ) или фибромиалгии (синдрома). Подходящими пищевыми и продовольственными продуктами в соответствии с изобретением, включая воду, являются, например, те, которые определены (не исчерпывающе) в Регламенте (ЕС) № 178/2002 от 28 января 2002 г., и такие, как выпечка и напитки, и составы для детского питания. К пищевой добавке в соответствии с изобретением можно добавить подходящий физиологически совместимый носитель.

Фармацевтические препараты в соответствии с изобретением могут быть приготовлены в виде дозированных единиц. Это означает, что препараты имеют форму отдельных частей, предпочтительно капсул и флаконов, содержание активного вещества в которых соответствует доле индивидуальной дозы или кратно ей. Дозированные единицы могут, например, содержать 1, 2, 3 или 4 индивидуальные дозы или 1/2, 1/3 или 1/4 индивидуальной дозы. Индивидуальная доза предпочтительно содержит количество средства по изобретению, которое вводят при применении, и обычно соответствует полной суточной дозе, половине суточной дозы, трети суточной дозы или четверти суточной дозы. Предпочтительно дозу вводят три раза в день, предпочтительно в форме таблетки или капель, в частности, утром, во время обеда и вечером, необязательно во время еды.

Под нетоксичными, инертными, фармацевтически пригодными веществами-носителями понимают твердые, полутвердые или жидкие растворители, наполнители и вспомогательные вещества любого типа, такие как а) наполнители и сухие разбавители, например крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит, декстрины, мальтодекстрин и окись кремния, высокодисперсный диоксид кремния, б) связующие вещества, например

карбосиметилцеллюлоза, порошковая целлюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, в) увлажнители, например глицерин, г) разрыхлители, например агар, карбонат кальция и карбонат натрия, д) замедлители растворения, например, парафин, и е) ускорители резорбции, например, четвертичные аммониевые соединения, ж) смачивающие вещества, например, цетиловый спирт, моностеарат глицерина, з) абсорбенты, например, каолин и бентонит и и) скользящие вещества, например, тальк, стеарат кальция и магния, и твердые полиэтиленгликоли или смеси веществ, указанных в а)- и).

Таблетки, покрытые сахаром таблетки, пилюли и гранулированные вещества могут быть снабжены стандартными покрытиями и оболочками, необязательно содержащими замутнители, например такие, как (не исчерпывающе) гипромеллоза, микрокристаллическая целлюлоза, стеариновая кислота, диоксид титана, а также могут иметь такой состав, чтобы, если это требуется, высвободить активное вещество (вещества) только или предпочтительно в определенной части кишечного тракта с задержкой, при этом, например, можно использовать полимерные вещества и воски в качестве медленно распадающихся соединений.

Таким образом, изобретение также относится к фармацевтическому препарату, содержащему средство по изобретению вместе со вспомогательными веществами и добавками.

### **Примеры и чертежи:**

Следующие примеры и чертежи используются исключительно для пояснения изобретения, не ограничивая изобретение этими примерами.

#### **Пример 1:**

Модель клетки:

#### Культивирование клеток:

Используемые клетки нейробластомы человека SH-SY5Y были стабильно трансфицированы человеческой ДНК APP695 дикого типа (APP) (Гревал Р., Ройтце М., Дилбергер Б. и др. (2020) Очищенные олеокантал и лигстрозид защищают от митохондриальной дисфункции в моделях ранней стадии болезни Альцгеймера и старения мозга. Эксп. Нейрол 328: 113248, Штокбюргер Ц., Гольд Викки А. М., Паллас Т. и др.

(2014) Клеточная модель начальной фазы sporadic болезни Альцгеймера. Дж. Альцгеймер Диз. 42: 395–411).

Клетки SH-SY5Y-APP культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в культуральной среде (DMEM), дополненной 10% (об./об.) инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки, 60 мкг/мл стрептомицина, 60 ЕД/мл пенициллина, 0,3 мг/мл гигромицина, аминокислот заменимых для MEM и 1 мМ пирувата натрия 1%. Клетки пересеивали каждые 3 дня и использовали, когда они достигали 70-80% слияния.

Клетки инкубировали в течение 24 часов с 200 мкМ оротата магния, 10 мкМ фолиевой кислоты и их комбинацией. В качестве контрольной использовали инкубацию с DMEM.

#### Измерение A $\beta$ 1-40:

Через 24 часа инкубации среду собирали в ёмкости под среду для культивирования клеток, и клетки промывали холодным физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS). Затем полученную суспензию центрифугировали в течение 5 минут при 220g. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок клеток ресуспендировали в 1,5 мл PBS и ингибитора протеазы. Затем раствор центрифугировали в течение 5 минут при 112g и удаляли надосадочную жидкость. Осадок клеток собирали, добавляли 600 мкл буфера для экстракции клеток (компании «Термо Фишер Сайентифик», Уолтем, штат Массачусетс, США) и инкубировали в течение 30 минут. Затем полученную суспензию центрифугировали в течение 10 минут при 13000g. Надосадочную жидкость переносили в новый флакон и хранили при -80°C. Надосадочные жидкости размораживали на льду и пипеткой переносили в 384-луночный планшет (компании «Грайнер Био-Оне», Кремс-мюнстер, Австрия). Для определения концентрации  $\beta$ -амилоида использовали набор HTRF amyloid beta 1-40 (компании Сисбио, Кодоле, Франция). Образцы использовали в соответствии с инструкциями производителя. Затем измеряли оптическую плотность при 665 и 622 нм. Затем значения  $\beta$ -амилоида стандартизировали по содержанию белка.

#### Определение количественного содержания белка:

Содержание белка определяли с использованием набора для анализа белка Pierce™ (компании «Термо Фишер Сайентифик», Уолтем, штат Массачусетс, США). Были соблюдены все инструкции производителя. В качестве стандарта использовали

бычий сывороточный альбумин. Протокол был основан на публикации Смит и др. (Смит П.К., Крон Р.И., Хермансон Г.Т. и др. (1985) Измерение белка с использованием бицинхониновой кислоты. Аналитическая биохимия 150: 76–85).

Нематода (*Caenorhabditis elegans*)

*C. elegans* и штаммы бактерий

Штамм N2 дикого типа *C. elegans* был выведен в Центре генетики *Caenorhabditis elegans* (Университет Миннесоты, штат Миннесота, США). Нематоды находились на чашках с агаровой средой для выращивания нематод (NGM), на которые наносили культуру *E. coli* OP50 при 20°C в соответствии со стандартными протоколами (Бреннер С. (1974) Генетика *Caenorhabditis elegans*. Генетика 77: 71–94). Для всех экспериментов с помощью стандартного протокола обесцвечивания были созданы синхронные популяции (Тереза Стирнагель (2006) Обслуживание *C. elegans*. Вормбук: 1–11).

#### Выращивание и обработка:

Синхронные личинки дважды промывали буфером M9, подсчитывали их количество и доводили его до 10 личинок на 10 мкл. Нематоды переносили пипеткой в 96-луночные планшеты (компания «Грайнер Био-Оне», Фриккенхаузен, Германия). Концентрацию OP50 доводили до 1 при оптической плотности OD600 с жидкой NGM-средой. OP50-NGM добавляли в качестве стандартизированного источника питания, при этом объем личинок был в 4,4 раза больше использованных с раствором M9. Личинки L1 содержались при температуре 20°C при постоянном встряхивании и достигали половой зрелости в течение 3 дней. После достижения молодого возраста и за 48 часов до начала эксперимента добавляли эффекторы. В качестве эффекторов применяли 100 мкМ оротата магния и 50 мкМ фолиевой кислоты, растворенных в M9. Буфер M9 применяли в качестве контрольного.

#### Устойчивость к тепловому стрессу:

Как описано выше, на одну лунку в 96-луночном микропланшете выращивали примерно 10 нематод. После 48 часов инкубации, как описано выше, применяли эффекторы. Время до гибели нематод определяли с помощью Микропланшета для теста на термостойкость, как описано в Фитценбергер и др. (Фитценбергер Е., Дойзинг Д.Й.,

Маркс К. и др. (2014) Полифенол кверцетин защищает мутацию MBЭ-1 *Caenorhabditis elegans* от вызванного глюкозой снижения выживаемости при тепловом стрессе в зависимости от протеинов SIR-2.1, DAF-12 и протеасомной активности. Молекулярное питание и исследования Продуктов Питания 58: 984–994).

Нематоды вымывали из лунок буфером M9 во флаконах по 15 мл с последующими тремя дополнительными этапами промывки. В каждую лунку черного 384-луночного микропланшета (компания «Грайнер Био-Оне», Фриккенхаузен, Германия) добавляли 6,5 мкл раствора буфера M9/Tween® 20 (1% по объему). Затем 1 мкл буфера M9 переносили пипеткой в каждую лунку с нематодой под стереомикроскопом (Бреукховен Микроскоп Системз, Капелле-ан-ден-Эйссел, Нидерланды) и смешивали с 7,5 мкл SYTOX™ green (конечная концентрация 1 М; компания «Лайф Текнолоджиз», Карлсруэ, Германия). Для предотвращения испарения воды планшеты запечатывали герметизирующей пленкой Rotilabo (компания «Грайнер Био-Оне», Фриккенхаузен, Германия). Вызывали термический шок (37°C) и измеряли флуоресценцию с помощью планшетного ридера ClarioStar (компания BMG, Ортенберг, Германия) каждые 30 минут в течение 17 часов. Для получения зеленой флуоресценции SYTOX™ длину волны стимуляции устанавливали на 485 нм, и эмиссию регистрировали при 538 нм.

### **Пример 2:**

Окислительное фосфорилирование (OxPhosC) митохондрий, выделенных из гиппокампа трансгенных крыс F344-AD после лечения

После декапитации крыс F344-AD выделяли гиппокамп и гомогенизировали его при 4°C. После центрифугирования выделенные митохондрии помещали в камеру респирометра. С помощью платинового электрода измеряли влияние последовательного добавления субстратов и ингибиторов в дыхательную цепь на потребление кислорода в камере, и, таким образом, исследовали активность отдельных комплексов (разработано Тиной М. Шварцкопф, Конрадом А. Кохом, Йохеном Кляйном, Нейродегенерация после транзиторной ишемии головного мозга у старых мышей: Положительное влияние билобалида, Исследования мозга, том 1529, 5 сентября 2013 г., стр. 178-187, с дополнительными ссылками).

Обозначения	Обработка	Дозировка
A, E (контрольный)	Без добавок	0
B	Магния оротат	500 мг/кг
C	Бенфотиамин	300 мг/кг
D, F (коктейль)	Магния оротат	500 мг/кг
	Бенфотиамин	300 мг/кг
	Витамин B12	1 мг/кг
	Фолиевая кислота	10 мг/кг
	Витамин D3	3000 МЕ/кг

Результаты представлены на фиг.3.

На фиг.1 показано количество  $\beta$ -амилоидного пептида ( $A\beta_{1-40}$ ) в пг/мг белка в SH-SY5Y-APP695 после 24 часов инкубации с активными веществами A.) фолиевая кислота (фолат; 10 мкМ) и оротат магния (200 мкМ) и их комбинации и B.) фолиевая кислота (фолацин; 10 мкМ) и оротат цинка (200 мкМ) и их комбинации. Показаны соответствующие средние значения из 6 отдельных тестов ( $n=6$ ) и соответствующие стандартные отклонения ( $\pm$  SEM). Значения ( $***p<0,001$  и  $****p<0,0001$  соответственно) определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Пунктирная линия показывает среднее значение контроля (217,4 пг/мг  $A\beta$ ).

На фиг.1A проиллюстрирован синергетический эффект фолиевой кислоты и оротата магния, поскольку:

$$\Delta \text{ комбинации} > \Delta \text{ оротата магния} + \Delta \text{ фолата.}$$

На фиг.2 показана продолжительность жизни *C. elegans* в испытании на тепловой стресс в виде кривых Каплана-Майера после обработки оротатом магния и фолиевой кислотой («фолат») и их комбинациями. В качестве контрольных использовали необработанных червей (M9 [контроль]). Показаны соответствующие средние значения и соответствующие стандартные отклонения ( $\pm$  SEM). Значение ( $**p < 0,01$ ) рассчитывали с помощью логарифмического рангового теста (Мантела-Кокса).

На фиг.3 показана активность (МЕ = мкмоль/мин) окислительного фосфорилирования (OxPhosC) митохондрий, выделенных из гиппокампа трансгенных

крыс F344-AD. На оси абсцисс нанесены четыре обработки (B, C, D, F) и две возрастные группы (6-7 месяцев, 15-16 месяцев). Между 6-7-месячными животными нет существенных различий в OхPhosC вследствие обработки, даже несмотря на то, что обработка коктейлем (группа D) вызывала увеличение OхPhosC. OхPhosC статистически значимо снижается в зависимости от возраста (срав. группу A с группой E). Лечение коктейлем может статистически значимо повлиять на этот эффект возраста или даже обратить его вспять (срав. группу E с группой F).

## Литература

1. Харди Дж. Сто лет исследованиям болезни Альцгеймера. *Нейрон*. 2006 г.; 52(1):3-13.
2. Селкоу Д.Дж. и Харди Дж. 25 лет амилоидной гипотезе болезни Альцгеймера. *EMBO Мол Мед*. 2016; 8(6):595-608.
3. Куэрфурт Х.В. и Ла Ферла Ф.М. Болезнь Альцгеймера. *Н Ингл Дж Мед*. 2010 г.; 362(4):329-344.
4. Гарольд Д., Абрахам Р., Холлингворт П., Симс Р., Герриш А., Хамшер М.Л., Пахва Дж.С., Москвина В., Доузел К., Уильямс А., Джонс Н., Томас С., Стреттон А., Морган А.Р., Лавстон С., Пауэлл Дж. и др. . Полногеномное ассоциативное исследование, выявляющее варианты CLU и PICALM, связанные с болезнью Альцгеймера. *Нат Жене*. 2009 г.; 41(10):1088-1093.
5. Ламберт Дж.К., Ибрагим-Вербаас К.А., Гарольд Д., Надж А.С., Симс Р., Белленгес К., ДеСтафано А.Л., Бис Дж.К., Бичем Г.В., Гренье-Боли Б., Руссо Г., Тортон-Уэллс Т.А., Джонс Н., Смит А.В., Чураки В. , Томас С. и др. Метаанализ 74046 человек выявил 11 новых локусов предрасположенности к болезни Альцгеймера. *Нат Жене*. 2013; 45(12):1452-1458.
6. Генин Э., Ханнекин Д., Валлон Д., Слигерс К., Хилтунен М., Комбаррос О., Буллидо М.Дж., Энгельборгс С., Де Дейн П., Берр С., Паскье Ф., Дюбуа Б., Тоньони Г., Фиве Н., Брауэрс Н., Беттенс К. и др. др. APOE и болезнь Альцгеймера: основной ген с полудоминантным наследованием. *Мол Психиатрия*. 2011 г.; 16(9):903-907.
7. Надж А.С., Джун Г., Бичем Г.В., Ван Л.С., Вардараджан Б.Н., Бурос Дж., Галлинс П.Дж., Буксбаум Д.Д., Ярвик Г.П., Крейн П.К., Ларсон Э.Б., Берд Т.Д., Боев Б.Ф., Графф-Рэдфорд Н.Р., Де Ягер П.Л., Эванс Д. , и другие. Распространенные варианты MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 и EPHA1 связаны с поздним началом болезни Альцгеймера. *Нат Жене*. 2011 г.; 43(5):436-441.

8. Даулатзай М.А. Церебральная гипоперфузия и гипометаболизм глюкозы: ключевые патофизиологические модуляторы способствуют нейродегенерации, когнитивным нарушениям и болезни Альцгеймера. Дж Неуроши Рез. 2017; 95(4):943-972.
9. Бальетто-Варгас Д., Ши Дж., Ягер Д.М., Агер Р. и Ла Ферла Ф.М. Диабет и болезнь Альцгеймера взаимосвязаны. Неуроши Биобехав Рев. 2016; 64:272-287.
10. Уайлд С., Роглик Г., Грин А., Сикри Р. и Кинг Х. Глобальная распространенность диабета: оценки на 2000 год и прогнозы на 2030 год. Лечение диабета. 2004 г.; 27(5):1047-1053.
11. Абате Г., Марциано М., Рунгратавананич В., Мемо М. и Уберти Д. Питание и старение: в центре внимания болезнь Альцгеймера. Оксид Мед Селл Лонгев. 2017; 2017:7039816.
12. Кызылбаш Н., Грегсон Дж., Джонсон М.Э., Пирс Н., Дуглас И., Уинг К., Эванс С.Дж. и Покок С.Дж. ИМТ и риск развития деменции у двух миллионов человек за два десятилетия: ретроспективное когортное исследование. Ланцет Диабет Эндокринолог. 2015 г.; 3(6):431-436.
13. Кордейн Л., Итон С. Б., Себастьян А., Манн Н., Линдеберг С., Уоткинс Б.А., О'Киф Дж.Х. и Бранд-Миллер Дж. Происхождение и эволюция западной диеты: последствия для здоровья в 21 веке. Ам. Дж Клин Нутр. 2005 г.; 81(2):341-354.
14. Nishida С., Уауи Р., Куманьика С. и Шетти П. Совместная консультация экспертов ВОЗ/ФАО по диете, питанию и профилактике хронических заболеваний: последствия процесса, продукта и политики. Паблик Хэлт Нутр. 2004 г.; 7(1A): 245-250.
15. Янсон Дж., Лаэдтке Т., Паризи Дж.Э., О'Брайен П., Петерсен Р.К. и Батлер П.С. Повышенный риск диабета 2 типа при болезни Альцгеймера. Диабет. 2004 г.; 53(2):474-481.

16. Кронер З. Связь между болезнью Альцгеймера и диабетом: диабет 3 типа? *Альтерн Мед Рев.* 2009; 14(4):373-379.
17. Кларк Дж.Р., Лира Е.С.Н.М., Фигейреду К.П., Фрозза Р.Л., Ледо Д.Х., Бекман Д., Каташима К.К., Разолли Д., Карвалью Б.М., Фразао Р., Сильвейра М.А., Рибейро Ф.К., Бомфим Т.Р., Невес Ф.С., Кляйн В.Л., Медейрос Р. и др. . Олигомеры Аbeta, ассоциированные с болезнью Альцгеймера, воздействуют на центральную нервную систему, вызывая нарушение регуляции периферического метаболизма. *ЕМБО Мол Мед.* 2015 г.; 7(2):190-210.
18. Джайс А., Эйнваллнер Э., Шариф О., Госсенс К., Лу Т.Т., Сојал С.М., Медьеси Д., Нейрайтер Д., Пайер-Пурани Дж., Далгаард К., Дювиньо Дж.К., Линдроос-Кристенсен Дж., Цапф Т.К., Аманн С., Салуццо С., Янчер Ф. и др. Гемоксигеназа-1 вызывает метавоспаление и резистентность к инсулину у мышей и людей. *Селл.* 2014; 158(1):25-40.
19. Калай Э.С. и Хотамислигил Г.С. Купирование воспалительных, но не метаболических вспышек. *Нат Мед.* 2013; 19(3):265-267.
20. Грэм Л.С., Хардер Дж.М., Сото И., де Врис В.Н., Джон С.В. и Хауэлл Г.Р. Хроническое употребление западной диеты вызывает сильную глиальную активацию у мышей старшего возраста и при мышинной модели болезни Альцгеймера. *Сай. Реп.* 2016 г.; 6:21568.
21. Родригес-Моран М., Герреро-Ромеро Ф. Пероральные добавки магния улучшают метаболический профиль людей с метаболическим ожирением и нормальным весом: рандомизированное двойное слепое исследование с плацебо контролем. *Арх. Мед. Рез.* 2014 июль; 45 (5): 388-93. doi: 10.1016/ж.архмед.2014.05.003. Epub 2014 11 мая
22. Мишулон Дэвид И ДРУГИЕ: «Роль фолиевой кислоты при депрессии и деменции», *ЖУРНАЛ КЛИНИЧЕСКОЙ ПСИХИАТРИИ* 2007, том. 68 Приложение 10, 2007 г., страницы 28-33

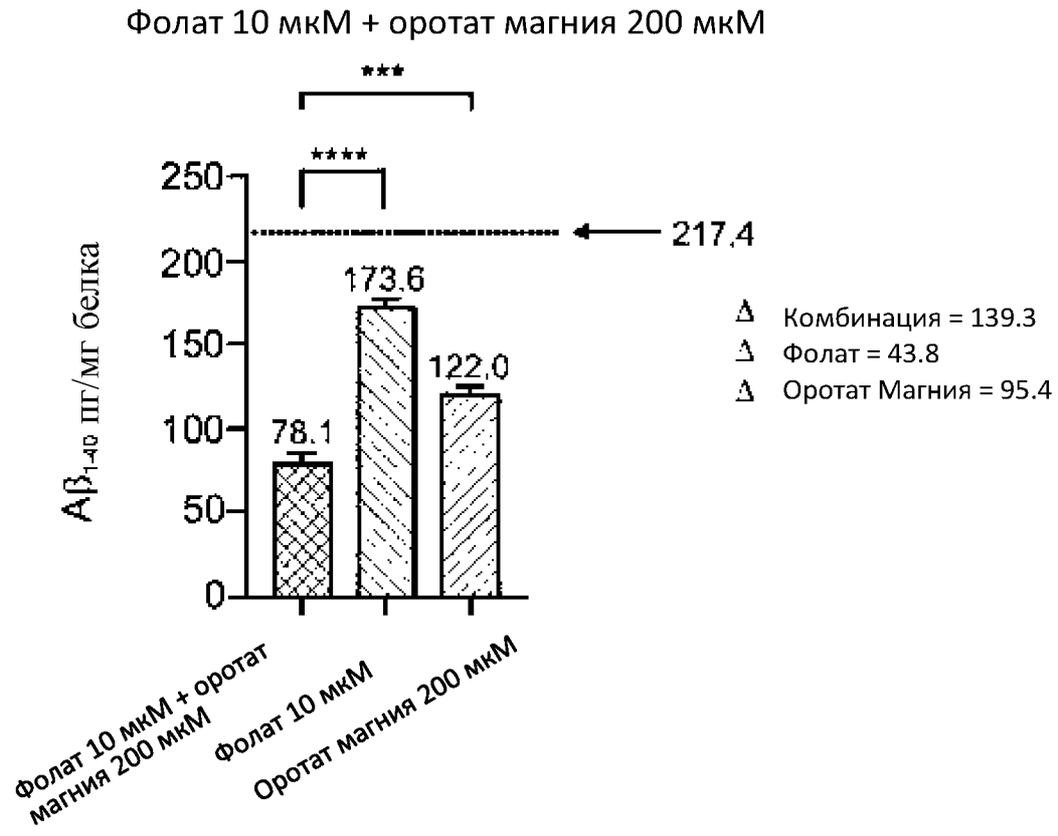
23. Вэньчжан Ван, Фанпэн Чжао, Сяопинь Ма, Джордж Перри, Сюнвэй Чжу, Дисфункция митохондрий в патогенезе болезни Альцгеймера: последние достижения, Молекулярная нейродегенерация (2020) 15:30
  
24. Саймон М. Белл, Кэти Барнс, Маттео Де Марко, Памела Дж. Шоу, Лаура Феррайоло, Дэниел Дж. Блэкберн, Анналена Веннери, Хизер Мортибойс, Митохондриальная дисфункция при болезни Альцгеймера: биомаркер будущего? Биомедицина 2021, 9, 63
  
25. Катрин Херпича, Кристина Франц, Урсула Мюллер-Вердан, Марио Ост, Кристина Норман, Возрастная усталость связана со снижением митохондриальной функции в мононуклеарных клетках периферической крови, Эксп. Геронтология 2021, Том. 144

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Средство, содержащее оротат магния и фолиевую кислоту или фолаты или их таутомеры и соли для применения в профилактике и лечении деменции.
2. Средство по п.1 для применения в профилактике и лечении деменции, выбранной из деменции при болезни Альцгеймера или болезни Альцгеймера, деменции при болезни Альцгеймера с ранним началом (тип 2), деменции при болезни Альцгеймера с поздним началом (тип 1), деменции при болезни Альцгеймера атипичного или смешанного типа, сосудистой деменции, деменции с тельцами Леви.
3. Средство, содержащее оротат магния и фолиевую кислоту или фолаты или их таутомеры и соли для применения в профилактике и лечении митохондриальной дисфункции, выбранной из группы, включающей сердечную недостаточность, неалкогольный гепатит, хроническую усталость, синдром хронической усталости или фибромиалгию.
4. Средство по любому из пп. 1-3, в котором молярное отношение оротата магния к фолиевой кислоте составляет 2-25:1, в частности 20:1.
5. Средство по любому из пп. 1-4, дополнительно содержащее по меньшей мере вещество или вещества, выбранные из группы, включающей оротат цинка, бенфотиамин, витамин D и витамин B.
6. Средство по любому из пп. 1-4, дополнительно содержащее по меньшей мере вещество или вещества, выбранные из группы, включающей оротат цинка, витамин D3, тиамин, витамин B6, витамин B12 и бенфотиамин.
7. Средство по любому из предыдущих пунктов, представляющее собой лекарственное средство или пищевую добавку, или сбалансированный рацион питания.

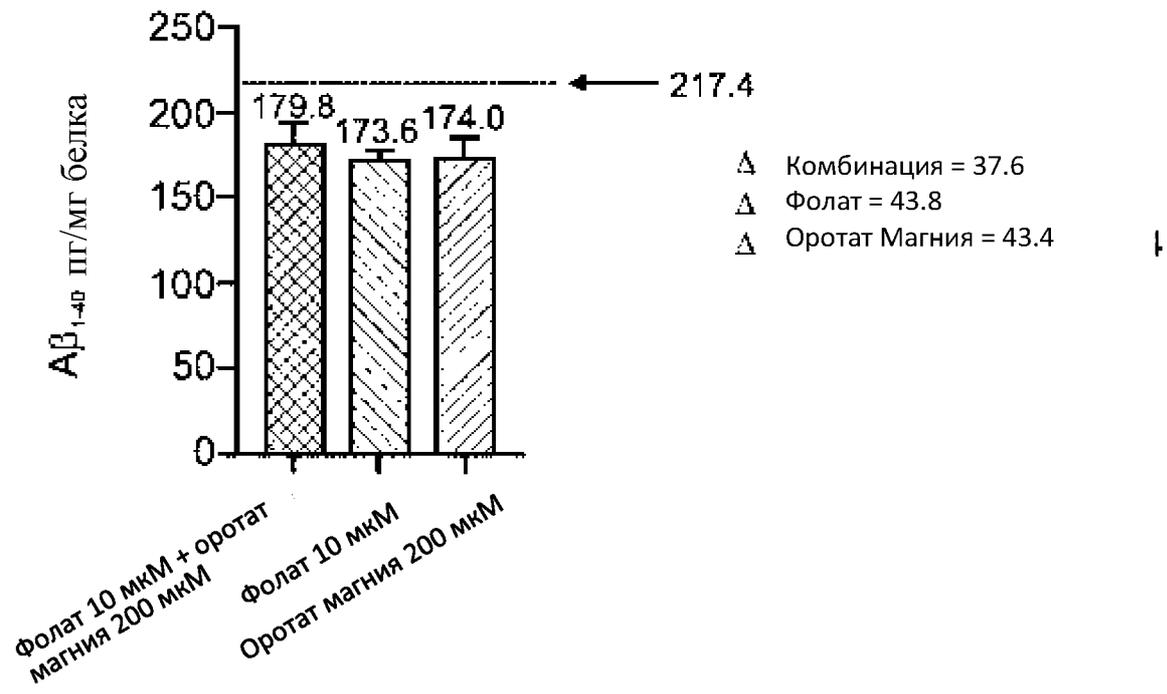
8. Фармацевтические препараты, содержащие средство по любому из пп. 1-7, в частности, в форме капель, сока, сиропа, таблеток, таблеток с сахарным покрытием, капсул, составов с замедленным высвобождением, настоев, мазей, эмульсий или порошка, обязательно вместе с подходящими веществами-носителями.

9. Фармацевтические препараты, содержащие средство по любому из пп. 1-7 вместе с вспомогательными веществами и добавками.

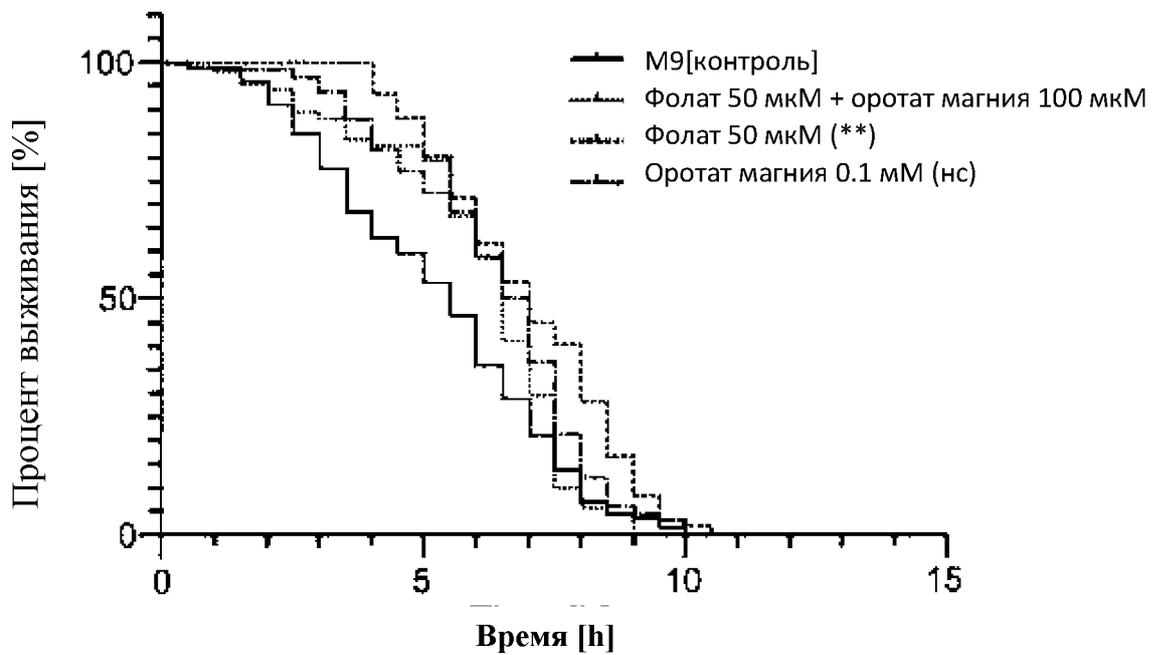


Фиг.1А

## Фолат 10 мкМ + оротат магния 200 мкМ

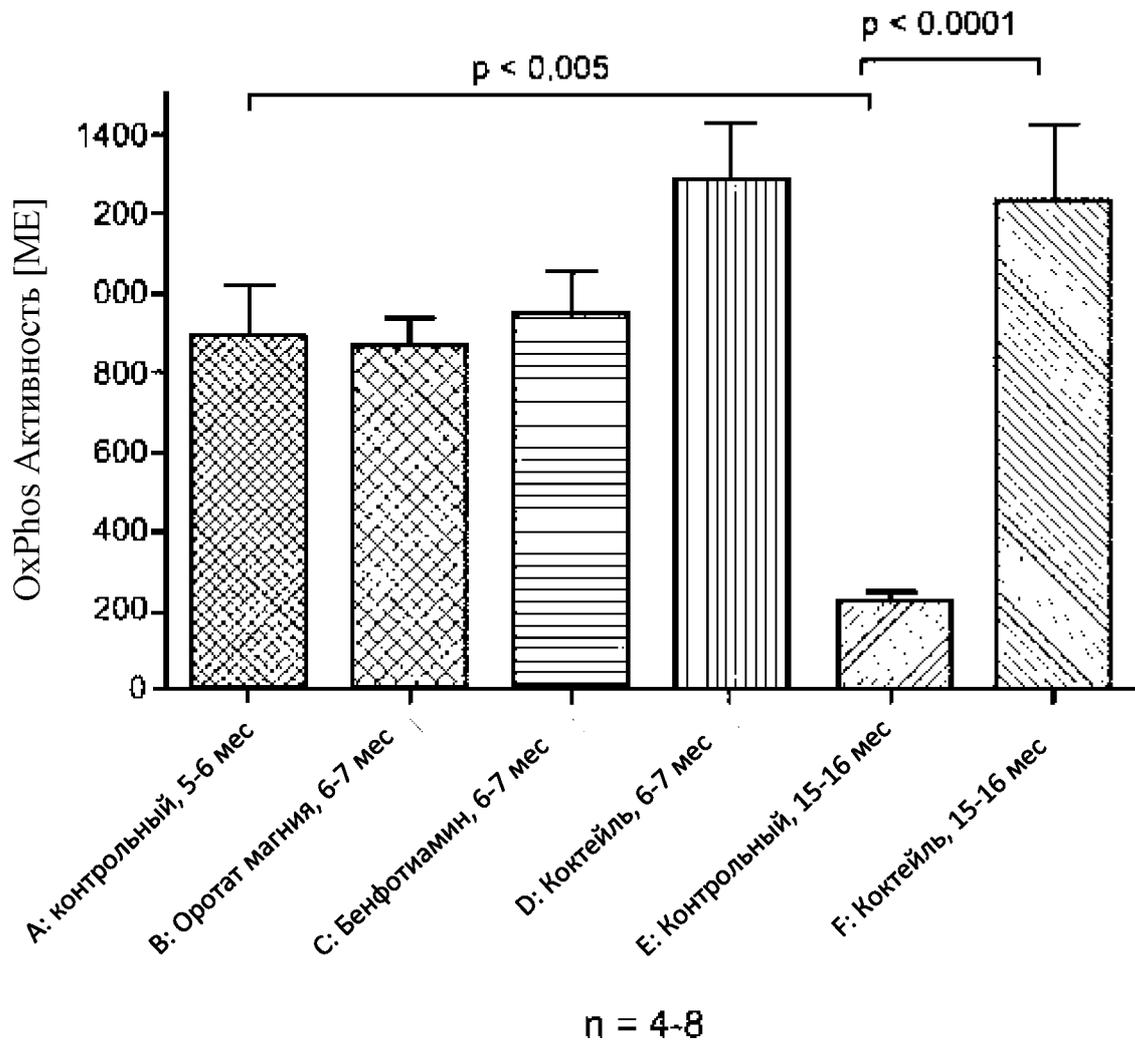


Фиг.1В



Фиг.2

## OxPhos Активность у крыс TgF344-AD



Фиг.3