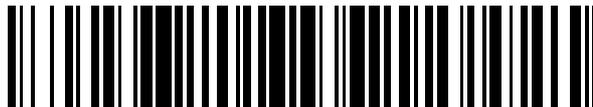


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 986**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2010 PCT/EP2010/052831**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2010 WO10100257**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2010 E 10715126 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2403534**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas activas en la prevención, estabilización y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

06.03.2009 EP 09425091

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

24.11.2016

73 Titular/es:

**COR.CON. INTERNATIONAL S.R.L. (100.0%)
Strada Langhirano, 264/1A, Località Fontanini
43124 Parma, IT**

72 Inventor/es:

CORNELLI, UMBERTO

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 590 986 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

Composiciones farmacéuticas activas en la prevención, estabilización y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a nuevas composiciones farmacéuticas que contienen antioxidantes que tienen actividad directa o indirecta a nivel cerebral, activas en la prevención, estabilización y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

10

Estado de la técnica

[0002] En las enfermedades neurodegenerativas tales como la demencia senil de tipo Alzheimer (EA) así como en sus formas prodrómicas, tales como deterioro cognitivo leve (MCI), se ha observado desde hace mucho tiempo un estado de OS (estrés oxidativo), determinable por índices comunes de estrés en plasma, así como en el fluido cerebroespinal (CSF) y en el tejido cerebral analizado postmortem.

15

[0003] A pesar de alguna incertidumbre de si OS es una causa temprana o un epifenómeno, sigue estando claro que los elementos implicados son varios e interconectados y que dichos elementos pueden alterarse tanto individualmente como de forma completa.

20

[0004] Para una evaluación precisa del OS cerebral, deben considerarse cuatro elementos clave: a) la barrera hematoencefálica; b) componentes pro-oxidantes, tales como amiloide y homocisteína; c) mitocondrias; d) células en circulación con particular referencia a los eritrocitos.

25

a) *La barrera hematoencefálica (BHE)*

[0005] El cerebro humano es el sistema interrelacionado más complejo en el cuerpo y, en términos de energía, requiere O₂ y glucosa a fin de funcionar.

30

[0006] Aunque comprende solo aproximadamente un 2 % de la masa corporal, el cerebro consume casi un 20 % del O₂ corporal, transportado por aproximadamente un 14-16 % del flujo cardiaco en una red de aproximadamente 600 km de vasos y microvasos cerebrales.

35

[0007] Se suministra la sangre a través de la barrera hematoencefálica (BHE), y la eliminación de metabolitos es principalmente por ruta venosa y también, en menor medida, el CSF.

[0008] El cerebro no tiene sistema linfático y de esta manera, el drenaje de proteínas procedentes del intersticio capilar venoso arterial, que en otras partes del cuerpo tiene lugar mediante esta ruta, es dependiente del CSF y del sistema venoso.

40

[0009] En contraste con otros sistemas con alto consumo de O₂ y energía, tal como músculos, que son monótonos en su actividad (contracción/relajación), el cerebro usa O₂ y energía a fin de mantener y transferir información (principalmente procesos dendríticos neuronales y astrocitos).

45

[0010] Una lesión endotelial en el cerebro, en términos de dinámica fisiológica, elimina la "información" contenida en las células cerebrales atendidas (procesos dendríticos, astrocitos) y solo puede restaurarse mediante "reaprendizaje".

50

[0011] Este último proceso es muy complejo, y puede incluso no tener lugar, ni ser eficaz, o puede realmente fallar, tal como en la demencia senil.

[0012] Debido a que las estructuras neuronales cerebrales no se pueden sustituir por duplicación, todo esto indica que con respecto al mantenimiento de la función cerebral (plasticidad) el sistema completo debe funcionar al nivel más elevado con el fin de no perder "información".

55

[0013] Una parte importante de este sistema complejo es la red antioxidante (AN).

[0014] La BHE es sin duda la estructura más afectada por el funcionamiento correcto de la AN ya que es una interfase muy distintiva y bien organizada en comparación con el endotelio común presente en el cuerpo.

60

[0015] La BHE se define realmente como una unidad neurovascular [1] para destacar la importancia de sus interconexiones. Una lesión en uno cualquiera de los elementos de la unidad neurovascular, sea en las neuronas, astrocitos (incluyendo oligodendrocitos y gliocitos) o en las células endoteliales, conduce a repercusiones en su función completa.

65

[0016] La protección de la BHE, implementada por los componentes de la AN, debe tener en cuenta en primer lugar la protección (directa e indirecta) de los vasos y su patencia así como de aquellas células que están más asociadas con esta, es decir, los eritrocitos.

5 **[0017]** La protección directa se lleva a cabo por los componentes de la AN destinados a la protección de las membranas (es decir, vitamina E, vitamina C y Se), aunque la protección directa se destina a la patencia de vasos usando otros componentes de la AN tales como flavonoides de Ginkgo biloba y terpenos, que tienen también considerable poder antioxidante [35-37], pero también en la protección de eritrocitos.

10 *b) Componentes pro-oxidantes*

[0018] La atención sobre este sujeto se centra en dos elementos específicos con capacidad oxidativa: homocisteína y sustancia amiloide.

15 **[0019]** La homocisteína es una causa conocida desde hace mucho tiempo de lesiones endoteliales [38, 39] en la medida en la que se han propuesto actualmente correlaciones entre sus niveles y cambios en el EEG (electroencefalograma) en individuos con EA (enfermedad de Alzheimer) [40]. La homocisteína es parte del metabolismo normal y es un punto de unión importante como reserva de metilo, resultado de la síntesis de ácido nucleico y la formación de cisteína que se usa a continuación para la síntesis de GSH (glutación reducido) [41].

20 **[0020]** La significancia de los niveles de homocisteína es por tanto evidentemente importante, siendo dependiente de un equilibrio complejo por el cual una ineficacia en cualquiera de los sistemas enzimáticos o una deficiencia en cualquier sustrato tal como las vitaminas del grupo B (especialmente B6, B9, B12) produce un desequilibrio en su producción. Esto ha conducido al uso suplementario de estas vitaminas con el objetivo de reducir sus niveles en sangre [49, 50], habiendo algunas diferencias de opinión con respecto a la necesidad de usar todos ellos o solo B6 [51].

25 **[0021]** La eficacia de este punto de unión metabólica, sin embargo, deriva también de la reactivación de la parte relativa a la producción de GSH, para la cual, la disponibilidad de las vitaminas B1, B2 y B3 es también importante. Esta reactivación permite a una sustancia potencialmente oxidante, similar a homocisteína, transformarse en equivalentes reductores tales como GSH que pueden reparar al menos una parte del daño.

30 **[0022]** Por tanto, intentando enfrentarse al problema de la homocisteína, los componentes que se van a usar son todos vitaminas del grupo B, excepto B5, que no es metabólicamente pertinente.

35 **[0023]** Sin embargo, los últimos trabajos clínicos [52] que se han centrado en la mortalidad cardiovascular no han estado de acuerdo con respecto a la actividad de las vitaminas del grupo B, en la medida en que su uso no está recomendado.

40 **[0024]** La otra sustancia formadora de lesión, debido a su capacidad oxidativa, es la sustancia amiloide.

45 **[0025]** Esta se forma a partir de APP (proteína precursora amiloide) a través de la acción de dos enzimas, α -secretasa y γ -secretasa [42, 43]. Una tercera enzima β -secretasa, usualmente en equilibrio con σ -secretasa, puede prevalecer sobre esta última y escindir de APP los péptidos A β 1-40 o A β 1-42 que son amiloidogénicos, derivando respectivamente de tejido cerebral (neuronas de astrocitos) o del endotelio de los vasos.

[0026] Estos péptidos se agregan para formar la sustancia amiloide.

50 **[0027]** Los motivos fundamentales por los cuales un sistema enzimático prevalece sobre el otro son desconocidos, siendo de una mayor certeza la producción en exceso de APP que se inicia cuando es necesaria la reparación de la membrana sináptica, para sostener por lo tanto la plasticidad sináptica.

55 **[0028]** Si por cualquier motivo el mecanismo de reparación sináptica no está regulado, la reparación no será eficiente y eficaz y la sobreabundancia de péptidos amiloides estimulará su agregación para formar la sustancia amiloide, primeramente en la forma de placas difusas, a continuación, con tiempo, en la forma de placas seniles.

[0029] En resumen, la presencia de placas cerebrales difusas y de placas seniles (siendo mayores que las difusas) son evidencia de un intento continuo de reparación dando como resultado una reparación interrumpida.

60 **[0030]** Los péptidos A β tienen una acción bivalente (antioxidante/pro-oxidante) pero si se produce en grandes cantidades son oxidantes [44, 45] y tienen efectos constrictivos sobre los vasos cerebrales [46].

[0031] Su presencia genera OS local que afecta a las proteínas en el primer momento.

65 **[0032]** Debido a que se produce en las células, primeramente, el OS celular aumenta entonces cuando se exportan los péptidos, generan OS en el entorno de las membranas celulares con las que entran en contacto.

[0033] La naturaleza reactiva de estos péptidos les proporciona la capacidad de agregarse naturalmente (en solución fisiológica), y, más aún, si entran en contacto con sustancias capaces de estimular su polimerización, ya sean sustancias cargadas tanto negativa como positivamente.

5 **[0034]** Las formas agregadas consideradas como más tóxicas son dímeros y trímeros solubles [47, 48] que también crean OS locales, mientras que la forma fibrilar con más de 8-10 péptidos no tiene actividad neurotóxica.

10 **[0035]** Comprendido en el concepto de modulación fisiológica, es importante limitar el estallido oxidativo debido a los péptidos amiloidogénicos ya que es autosostenible; en otras palabras, el péptido A β oxida un sustrato, lo que luego le permite agregarse.

[0036] La estrategia de modulación fisiológica es limitar esta tendencia para proteger los sustratos más fácilmente oxidables, tales como las proteínas y los fosfolípidos de membrana, con la AN.

15 **[0037]** Entre los compuestos de la AN, el producto fisiológico que cumple más con estas características es la carnosina, ya que protege las proteínas del OS inducido por amiloide [32-34].

20 **[0038]** El amiloide, en su forma inactiva, tiende a unirse al endotelio y su deposición, debida a la reactividad del vaso, restringe el tamaño del microvaso.

[0039] Por tanto, se desea aumentar el tamaño del vaso para permitir un drenaje de vaso mejorado, utilizando compuestos de la AN típicos tales como los flavonoides de Gingko biloba y terpenos [35-37] que han demostrado poseer esta actividad.

25 *c) Las mitocondrias como productores de OS cerebral*

[0040] Como se sabe, las mitocondrias están compuestas por cuatro compartimentos, teniendo cada uno funciones específicas: una membrana externa, relativamente porosa; una membrana interna, intrincada, para formar las denominadas crestas; un espacio intermembrana que tiene un gradiente de H⁺; la matriz mitocondrial.

30 **[0041]** Existen al menos 7 sistemas conocidos por generar ROS (especies de oxígeno reactivas) en la mitocondria, capaces por tanto de producir OS, contrarrestadas por al menos varios sistemas antioxidantes [23]. Se ha observado que cualquier cambio en los citocromos de la cadena respiratoria da como resultado dos fenómenos paralelos: producción de ATP reducida (adenosina trifosfato) y producción de ROS aumentada [4, 21, 24].

35 **[0042]** Presentes también en la matriz están las NOS (óxido nítrico sintetasas) y por consiguiente se genera NO^{*}. En caso de disfunción de la cadena respiratoria, un exceso de O₂^{*} (superóxido) estimula la producción de ONOO⁻ y posteriormente de OH^{*}.

40 **[0043]** La contigüidad del ADNmt (ADN mitocondrial), los ribosomas y los ácidos grasos presentes en la matriz permite su oxidación por los diferentes ROS que surgen de las pérdidas en la cadena de producción de energía.

45 **[0044]** La abundancia de mitocondrias endoteliales en la BHE es la evidencia de la energía requerida para mantener las uniones estancas de la pared endotelial, estructuras que pueden cambiar rápidamente incluso en relación con el estrés mecánico sistólico.

50 **[0045]** Como se sabe ahora, la producción de ATP corresponde a la producción de O₂^{*} debida a pérdidas y su transformación en H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) mediante la superóxido dismutasa (SOD). H₂O₂ tiene una vida media reactiva que permite su difusión, siendo capaz de dispersarse tanto en la matriz mitocondrial como en el exterior de la propia membrana mitocondrial; en otras palabras, exporta el estrés oxidativo (OS).

[0046] El ADN mitocondrial (ADNmt), que es rico en bases de guanosina, está entre las primeras macromoléculas que son atacadas por esta exportación.

55 **[0047]** En condiciones de OS cerebral, comúnmente observadas en la demencia senil de tipo Alzheimer (EA) o en el MCI (deterioro cognitivo mínimo) que puede preceder a este, existe una producción aumentada de 8-OHdG (hidroxil desoxiguanosina), un producto típico de la oxidación del ADN. Como resultado, algunas de las proteínas citocrómicas que dependen del funcionamiento del ADNmt no se sintetizarán correctamente por el sistema ribosómico, con la consiguiente pérdida de la energía necesaria para que se produzcan las funciones mitocondriales [2-5].

60 **[0048]** El ADNmt incluso se puede reparar, aunque se requiere ATP para conseguirlo.

[0049] Se puede derivar una compensación inicial del ATP importado de la glucólisis citoplásmica.

65

[0050] Esta compensación debe permitir la reparación del ADNmt dañado, se puede restaurar la normalidad. Si no puede tener lugar la importación del ATP o está limitada, el déficit de energía generará un círculo vicioso con la producción de ROS adicional, conduciendo a la apoptosis y a la muerte celular.

5 **[0051]** Aún comprendida todavía en el contexto del OS en la EA, se notifica un aumento en las proteínas oxidadas tal como las proteínas carboniladas de AGE (proteínas glicosiladas), así como la oxidación de los lípidos de membrana detectados mediante un aumento en los isoprostanos, y finalmente la oxidación menos bien conocida de los proteoglicanos (PG) [30, 31]. Estos últimos, a la vista de sus cargas negativas, inician y estabilizan la agregación del péptido amiloidogénico y la formación de sustancia amiloide y de ovillos neurofibrilares (NFT).

10 **[0052]** Se han encontrado todos estos derivados oxidados en tejido cerebral post-mortem (particularmente en aquellas áreas del cerebro comprometidas normalmente en la EA) y en fluidos biológicos (sangre, orina, CSF).

15 **[0053]** El análisis de la funcionalidad mitocondrial en sujetos con EA ha destacado defectos en 3 sistemas relacionados con el metabolismo de la energía: la reducción en la actividad de la piruvato deshidrogenasa, una σ -ceto-glutarato deshidrogenasa y una citocromo oxidasa [25, 26].

20 **[0054]** Ciertamente, esta condición implica que en individuos afectados por la EA, se observan anomalías vasculares muy prematuras, caracterizadas por la pérdida de mitocondrias en células endoteliales y el engrosamiento y la división de la membrana basal, con la consiguiente pérdida de función de la BHE [6, 9].

[0055] El contexto en el que la EA y todas sus etapas prodrómicas (tales como MCI) se desarrollan, ha estado, sin ninguna duda vinculado al OS [7 8].

25 **[0056]** El hecho de que OS sea una causa o un epifenómeno emerge como un falso problema, en el que el OS en cualquier caso da lugar a que progrese la enfermedad [3, 4].

30 **[0057]** Si acaso, el problema presentado es como hacer frente al OS cerebral, decidiendo cuáles son los elementos que se mantienen constantemente elevados y que generan disfunción mitocondrial u otras condiciones de estrés oxidativo.

[0058] Como elemento inicial, se puede considerar una disfunción en la producción de NO^+ , con las consiguientes repercusiones sobre el tono vascular.

35 **[0059]** Como se sabe, la síntesis de NO^+ depende de cuatro sintetetasas, concretamente inducible (iNOS), endotelial (eNOS), neuronal (nNOS), así como una cuarta, definida como mitocondrial (mNOS), todas las cuales utilizan dimetilargininasa para hidrolizar la dimetil arginina que permite que se produzca el NO^+ . La expresión de la dimetilargininasa está drásticamente aumentada en la EA [10]. La consecuencia de todo esto es un aumento general en las NOS y en particular de iNOS en las células gliales y en las neuronas del hipocampo [11-13].

40 **[0060]** Se esperaría que la vasodilatación que no surge, sin embargo, debido a condiciones locales se caracterice también por un aumento en el O_2^+ . Estos acontecimientos conducen a la formación de peroxinitrito (ONOO^-) seguido por OH^+ , y de esta manera, en vez de la vasodilatación, el resultado es la amplificación de OS [14-15] con la consiguiente vasoconstricción.

45 **[0061]** La presencia simultánea del péptido amiloide derivado de célula endotelial ($\text{A}\beta$), ya en sí mismo productor de vasoconstricción [16], acoplada con su deposición en la microvasculatura, conduce al estrechamiento de la luz. La incidencia de producción de $\text{A}\beta$ abundante no es aleatoria, sino está relacionada con la necesidad de sustitución, reparación, plasticidad y generalmente reaprendizaje como se ha definido anteriormente. El resultado final de este proceso completo es la perfusión reducida y una alteración en la funcionalidad de los vasos cerebrales [6]. Todo esto da como resultado una reparación interrumpida, en otras palabras, sustancia amiloide NFT_1 , placas difusas y a continuación placas seniles.

50 **[0062]** Para proporcionar protección a las mitocondrias con compuestos de la AN es necesario: a) soportar los niveles de la coenzima Q10 para proteger la cadena respiratoria; b) soportar con vitaminas B1, B2, B3 el ciclo de las pentosas fosfato que aumenta la disponibilidad del ATP citoplásmico para exportar en la mitocondria; c) aumentar la disponibilidad del GSH libre y unido a las enzimas antioxidantes suministrando sus precursores Se y L-cisteína.

60 *d) El aspecto significativo final de las modificaciones cerebrales relacionadas con OS se refiere a las células en circulación, en el primer caso, eritrocitos*

[0063] Entre todas las partículas en circulación, los eritrocitos son los más expuestos al OS por que, debido a su verdadero papel como suministradores, están continuamente en contacto con aquellos tejidos de los cuales pueden absorber el daño sustancial.

65

[0064] Como células fronterizas verdaderas pueden imitar el daño tisular y pueden experimentar también daño, en particular, cuando entran en contacto con tejido que está muy cercano, como ocurre en el cerebro, obligándolos a una deformación forzada. Si la luz del vaso, que consiste muy a menudo en una única célula endotelial (como en la BHE), está restringido adicionalmente debido a depósitos amiloides patológicos, su fisiología experimenta realmente una coartación morfológicamente demostrable. [6-8].

[0065] El papel de los eritrocitos es transportar O₂ incorporado en la hemoglobina y proteger el último de la oxidación. A la vista del consumo de O₂ por el sistema cerebral, la capacidad de transporte de los eritrocitos y su capacidad para alcanzar las células cerebrales son elementos fundamentales para la funcionalidad cerebral.

[0066] Cada eritrocito contiene 29 pg de hemoglobina correspondientes a aproximadamente 300 millones de moléculas de hemoglobina, que debe protegerse de la oxidación a metahemoglobina.

[0067] En la metemoglobina, el Fe²⁺ del grupo hemo se oxida a Fe³⁺ (ion férrico) que es incapaz de mantener la unión a O₂ en vez de H₂O. En otras palabras, en la formación de la metahemoglobina, el eritrocito pierde O₂, o, más bien, pierde la eficacia del transporte. A fin de evitar todo esto, se proporciona al eritrocito un sistema antioxidante, concretamente la metahemoglobina reductasa que es una enzima dependiente de NAD(P)H. El eritrocito debe obtener estos equivalentes reductores (NAD(P)H) que puede obtener solo produciendo ATP a partir de la glucólisis por medio del ciclo de la pentosa fosfato. Su capacidad de mantener la función depende por tanto del funcionamiento de este ciclo.

[0068] La capacidad funcional de los eritrocitos depende no solo de la protección del O₂ transportado, sino también de la eficacia de la membrana del eritrocito, que debe tener la elasticidad/deformabilidad necesaria para adaptarse mejor por sí misma al pasaje microvascular cuando se estrecha la luz. Todo esto significa que los fosfolípidos y el colesterol de la membrana no se oxidan porque esto produciría su endurecimiento.

[0069] El mantenimiento de la deformabilidad de los eritrocitos requiere proporcionar la reparación oxidativa de las estructuras de membrana, efectuándose esto, como con la hemoglobina, mediante la disponibilidad de los equivalentes reductores, derivando de nuevo del APT disponible procedente del ciclo de las pentosas fosfato.

[0070] En la EA, los eritrocitos están bajo estrés. Los péptidos Aβ se unen a los eritrocitos, no como tales, sino en forma dimérica o trimérica, es decir, en la etapa prefibrilar [17, 18]. Comprendidas en este tipo particular de agregación existen formas de una estructura que produce poros en la membrana del eritrocito, alterando su metabolismo y cambiando su morfología, volumen (aumento) y deformabilidad (rigidez).

[0071] Por tanto, la exportación desde el cerebro de Aβ (tanto de tipo vascular como tisular, Aβ 1-40 y Aβ 1-42 respectivamente) en la forma prefibrilar (por tanto prematura) se lleva a cabo a través de los eritrocitos. Pueden depositarlo sobre el endotelio debido a que su carga amiloide aumenta su unión al endotelio [20], particularmente si, como resultado de la luz reducida, se ven obligados a marginar. En otras palabras, pueden participar en la formación de un círculo vicioso si son incapaces de sacar el amiloide de la BHE.

[0072] Los eritrocitos tienen disponible la ruta sintética del GSH para implementar la regeneración necesaria del GSH, en particular cuando se ha utilizado para detoxificar las toxinas liposolubles [21, 22]. Para la síntesis del GSH se necesitan L-cisteína, glicina y glutamina (de esta forma, GSH es un tripéptido de glutamil-cisteinil-glicina) a la vez que es necesario también restaurar las enzimas antioxidantes tales como la glutatión peroxidasa (GPx), que cuando se une a la cisteína, forma la peculiaridad de la selenocisteína; este aminoácido concreto permite la actividad de la enzima en un amplio intervalo de pH, según se requiere para una eficacia más completa del eritrocito.

[0073] A la vista de las funciones que estas células deben realizar, es imperativo que, en condiciones de estrés oxidativo cerebral, tengan el conjunto de antioxidantes necesario.

[0074] En conclusión, analizando el estado de la técnica, como resultado de las notas de resumen anteriormente mencionadas, parece evidente que la búsqueda para confrontar el problema de la enfermedad de Alzheimer o más generalmente las diversas etapas de la demencia senil no se puede limitar a suponer la administración de sustancias genéricas con acción antioxidante para contrarrestar el OS cerebral, pero deben considerarse las causas individuales de OS identificadas hasta el momento y realizarse un intento de identificar otras causas que no han emergido todavía y que evidentemente han evitado hasta ahora llegar a una solución satisfactoria del problema.

Sumario de la invención

[0075] Los inventores han encontrado ahora una formulación de antioxidantes directos e indirectos, que constituyen un aspecto de la presente invención, que actúan sobre los cuatro elementos clave responsables del OS cerebral pero que actúan inesperadamente de una manera concreta sobre los eritrocitos, devolviéndolos en elevados porcentajes a su forma normal y la motilidad y la protección de estas características posteriormente con el fin de asegurar una circulación sanguínea normal en el cerebro y corregir por tanto el funcionamiento de todos aquellos mecanismos del cerebro que dependen de las sustancias necesarias que se introducen en el anterior

mediante los glóbulos rojos.

[0076] Es evidente que el alargamiento y el endurecimiento de los glóbulos rojos, es decir, su transformación en eritrocitos fusiformes (EF), restringe o evita su circulación a través de los vasos cerebrales y por consiguiente evita el suministro adecuado al cerebro y en consecuencia el funcionamiento adecuado del cerebro. Esto es en esencia lo que sucede en las diversas etapas de la demencia senil, desde el deterioro cognitivo mínimo (MCI) a la enfermedad de Alzheimer, que representa la etapa final y a partir de la cual, la recuperación no es ya posible. En individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer, los eritrocitos fusiformes (EF) están presentes en promedio en cantidades superiores al 15 % de los eritrocitos totales.

[0077] La composición de la presente invención contiene oxidantes directos e indirectos (es decir, que no tienen actividad antioxidante in vitro) que tienen los siguientes objetos: a) proteger proteínas, lípidos, ADN y proteoglicanos (PG) de la oxidación, b) reducir los niveles de homocisteína, c) mantener el ciclo de las pentosas-fosfato en las células en circulación.

[0078] Entre los compuestos conocidos capaces de actuar en el cerebro de la manera deseada, se han identificado y seleccionado los siguientes: carnosina, tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), nicotinamida (vitamina B3), piridoxina (vitamina B6), ácido fólico (vitamina B9), cianocobalamina (vitamina B12), vitamina C, vitamina E, coenzima Q10, β -caroteno, selenio, L-cisteína y extracto de Ginkgo biloba.

[0079] De forma más precisa, los componentes individuales tienen la siguiente actividad específica: la carnosina protege las proteínas cerebrales de la acción oxidante del amiloide que producen los AGE (productos finales de la glicosilación avanzada) y la reticulación; las vitaminas B1, B2 y B3 mantienen el ciclo de las pentosas fosfato en los eritrocitos y en las células cerebrales; las vitaminas B6, B9, B12 reducen los niveles plasmáticos de Hcy; Se y L-cisteína aumentan la producción de GSH; la coenzima Q10 mejora la función mitocondrial; la vitamina E, el beta-caroteno y la vitamina C protegen las membranas de la oxidación; Ginkgo biloba produce la vasodilatación en la micro/macrocirculación y proporciona un soporte antioxidante general al sistema. Todos los mencionados aditivos específicos proporcionan un efecto sinérgico sorprendente e inesperado para la composición farmacéutica resultante de la invención.

[0080] Adicionalmente, las dosificaciones óptimas y las proporciones mutuas para actuar contra el estrés oxidativo cerebral se identificaron a continuación para cada componente de dicha composición, siendo las dosificaciones en cualquier caso inferiores a las de las CDR.

Descripción detallada de la invención

[0081] Sorprendentemente, la composición de la invención ha mostrado proteger los eritrocitos del estrés oxidativo (OS) que se genera en pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer, que conduce a la deformación de dichos eritrocitos transformándolos en eritrocitos fusiformes (EF) que pierden su capacidad funcional para liberar O₂ en el cerebro y para eliminar la sustancia amiloide del cerebro. el término "para proteger del OS" significa que los eritrocitos fusiformes (EF) se devuelven a su estructura normal y se protegen durante la ejecución de su función, y de esta manera eliminar las sustancias amiloides y liberarlas fuera del cerebro en tejidos capaces de metabolizarlas (por ejemplo, hígado, bazo).

[0082] El efecto de la composición de la invención sobre los EF se mide por la diferencia porcentual de eritrocitos fusiformes presentes en la sangre del paciente antes y después del tratamiento con la composición de la invención.

[0083] De esta manera, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende carnosina, tiamina, riboflavina, nicotinamida, piridoxina, ácido fólico, cianocobalamina, vitamina C, la vitamina E, coenzima Q₁₀, β -caroteno, selenio, L-cisteína, y extracto de Ginkgo biloba.

[0084] Preferentemente, dicha composición farmacéutica comprende 40 a 50 % en peso de carnosina, 0,5 a 1 % en peso de tiamina, 0,5 a 1 % en peso de riboflavina, 5 a 12 % en peso de nicotinamida, 0,6 a 1,4 % en peso de piridoxina, 10 a 20 % en peso de vitamina C, 5 a 12 % en peso de vitamina E, 1 a 7 % en peso de coenzima Q₁₀, 0,5 a 5 % en peso de β -caroteno, 1 a 7 % en peso de L-cisteína, 8 a 15 % en peso de extracto de Ginkgo biloba.

[0085] Más preferentemente, dicha composición farmacéutica comprende 42 a 45 % en peso de carnosina, 0,6 a 0,8 % en peso de tiamina, 0,6 a 0,8 % en peso de riboflavina, 6 a 10 % en peso de nicotinamida, 0,8 a 1,2 % en peso de piridoxina, 12 a 15 % en peso de vitamina C, 7 a 10 % en peso de vitamina E, 3 a 6 % en peso de coenzima Q₁₀, 1 a 3 % en peso de β -caroteno, 3 a 6 % en peso de L-cisteína, 10 a 13 % en peso de extracto de Ginkgo biloba.

[0086] En una realización preferida, la composición farmacéutica consiste en 44 a 45 % en peso de carnosina, 0,6 a 0,7 % en peso de tiamina, 0,65 a 0,75 % en peso de riboflavina, 7,5 a 9 % en peso de nicotinamida, 0,8 a 1 % en peso de piridoxina, 0,07 a 0,1 % en peso de ácido fólico, 0,0004 a 0,0007 % en peso de cianocobalamina, 13 a 14 % en peso de vitamina C, 8,5 a 9,5 % en peso de vitamina E, 4 a 5 % en peso de coenzima Q₁₀, 2 a 2,5 % en peso de β -caroteno, 0,01 a 0,02 % en peso de selenio, 4 a 5 % en peso de L-cisteína, y 11 a 12 % en peso de extracto de

Ginkgo biloba.

[0087] En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de dicha composición farmacéutica para la preparación de un medicamento para evitar, estabilizar y tratar la enfermedad de Alzheimer y las disfunciones cognitivas conectadas a la anterior. De manera ventajosa, para este uso, los componentes individuales están presentes en la composición en una cantidad igual o inferior a la de la CDR (Cantidad diaria recomendada).

[0088] Preferentemente, una dosis unitaria de dicha composición farmacéutica comprende 90 a 110 mg de carnosina, 1,2 a 1,7 mg de tiamina, 1,4 a 1,8 mg of riboflavina, 14 a 24 mg de nicotinamida, 1 a 3 mg de piridoxina, 25 a 42 mg de vitamina C, 12 a 25 mg de vitamina E, 5 a 15 mg de coenzima Q₁₀, 2 a 9 mg de β-caroteno, 5 a 15 mg de L-cisteína, 20 a 32 mg de extracto de Ginkgo biloba.

[0089] De acuerdo con una realización preferida, una dosis unitaria de dicha composición farmacéutica consiste en 100 mg de carnosina, tiamina (B₁) 1,4 mg, riboflavina (B₂) 1,6 mg, nicotinamida (B₃) 18 mg, piridoxina (B₆) 2 mg, ácido fólico (B₉) 200 µg, cianocobalamina (B₁₂) 1 µg, vitamina C 30 mg, vitamina E 20 mg, coenzima Q₁₀ 10 mg, β-caroteno 800 RE, selenio 27,5 µg, L-cisteína 10 mg y extracto de Ginkgo biloba 25 mg, como se muestra también en la Tabla 1.

[0090] La Tabla 1 se refiere a la composición de dicha realización preferida como Fórmula F, indicando además los valores de la CDR referidos excepto para la vitamina E, que se utilizó a una CDR del 200 % (que se utilizó como la forma racémica). Como se puede observar, se encontró que las dosificaciones indicadas que son útiles para preparar la composición y para obtener los resultados requeridos en las diversas etapas de la demencia senil y en concreto, en la enfermedad de Alzheimer, son muy bajas estando entre el 25 % y el 100 % de la CDR.

Tabla 1. Fórmula F

	Dosis	CDR
Carnosina	100 mg	-
Tiamina (B ₁)	1,4 mg	100
Riboflavina (B ₂)	1,6 mg	100
Nicotinamida (B ₃)	18 mg	100
Piridoxina (B ₆)	2 mg	100
Ácido fólico (B ₉)	200 µg	100
Cianocobalamina (B ₁₂)	1 µg	100
Vitamina C	30 mg	50
Vitamina E	20 mg	200
Coenzima Q ₁₀	10 mg	-
β-caroteno	800 ER*	100
Selenio	27,5 mg	25
L-cisteína	10 mg	-
Extracto de Ginkgo biloba	28 mg	-
* ER significa equivalentes de retinol donde un ER = 6 µg de β-caroteno		

[0091] La composición dada en la Tabla 1 se refiere a una dosis unitaria preferida, pero la misma puede administrarse diariamente en una cantidad de 30 a 300 % dependiendo de la gravedad de la enfermedad a tratar, es decir, dependiendo de la etapa de emergencia cerebral para la cual se requiere la intervención.

[0092] En cualquier caso, uno de los aspectos fundamentales descubiertos es que no es posible mejorar el OS de los eritrocitos utilizando solo antioxidantes particularmente adecuados para actuar en el anterior, sino que deben utilizarse también antioxidantes que actúan sobre otros componentes específicamente identificados del sistema cerebral.

[0093] Solo con esta acción exhaustiva y sinérgica, resultó que era posible conseguir una reducción significativamente inesperada en los EF y por consiguiente, una mejora significativa de la patología, que está relacionada probablemente con la mayor eliminación de sustancia amiloide de la masa cerebral y, en cualquier caso, de una circulación sanguínea mejorada en el cerebro con la consiguiente reactivación de todos los mecanismos cerebrales.

[0094] A fin de hacer más evidentes los sorprendentes resultados y ventajas conseguidos por la composición farmacéutica de la invención, todos los datos se indican en el presente documento a continuación mostrando los efectos de un estudio clínico experimentado con un número significativo de pacientes.

[0095] A fin de determinar la reducción en los EF y si una reducción en los EF tiene el efecto clínico de reducir la progresión de la enfermedad (es decir, la gravedad de la enfermedad de Alzheimer (EA)), la composición se administró junto con donepezilo durante 6 meses a pacientes que padecían la EA y se comparó con un grupo tratado con donepezilo y un placebo La administración de donepezilo era necesaria en estos individuos que padecían la EA y que no se pueden tratar solo con placebo.

[0096] Donepezilo es un inhibidor conocido de la colinesterasa y se ha utilizado ya en la EA y en trastornos cognitivos en general.

10 Estudio clínico

[0097] Se dividió aleatoriamente una cohorte de 52 pacientes afectados por la EA en dos grupos que se siguieron durante un periodo de 6 meses de acuerdo con un diseño doble ciego.

[0098] Se trató un grupo de 26 sujetos con la Fórmula F en una ampolla de 2 fases (polvo en la tapa y diluyente en la ampolla a reconstituir en el momento del consumo); se trató otro grupo de 26 sujetos con un placebo indistinguible de la Fórmula F. El ensayo se llevó a cabo en pacientes ya tratados con donepezilo.

[0099] Los pacientes que padecían EA de acuerdo con los criterios NINCDS-ADRDA y NINDS-AIREN [McKhann G, Drackman Da, Folstein M et al Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: -report of the NINCDS-ADRDA work group under auspices of department of Health and Human Services task force on Alzheimer's disease. Neurology, 1984;34:939-944.

[0100] Roman GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T et al. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies: report of the NINDS-AIREN international Workshop. Neurology 1993;43:250-260]. Los sujetos aceptados eran aquellos con MMSE II > 21 con un diagnóstico de EA probable, ya en tratamiento con donepezilo durante al menos 2 meses a una dosis de 5 mg/día y en tratamiento estable durante al menos 3 meses en caso de otras enfermedades crónicas concomitantes. El alelo ApoE de tipo ε no se consideró como un criterio de inclusión o exclusión sino solo como una variable descriptiva.

[0101] Se excluyeron los pacientes que no eran ayudados por cuidadores, así como los pacientes con tumores malignos o aquellos tratados con quimioterapia. Se excluyeron también pacientes con una puntuación MMSE II < 21, con alcoholismo, o que padecían depresión, o aquellos en tratamiento con donepezilo durante menos de 2 meses, o en una dosificación de > 5 mg/día.

[0102] La mayoría de exclusiones fueron debidas a la gravedad de la enfermedad (MMSE II < 21) o a solo un periodo de tratamiento breve con donepezilo (< 2 meses) o al hecho de que los sujetos se estaban tratando con fármacos diferentes de donepezilo.

[0103] Todos los pacientes tomaron donepezilo a una dosis de 5 mg/día. Se trató un grupo con Fórmula F a una dosis de 1 ampolla/día por la mañana, inmediatamente antes del desayuno; se trató otro grupo con placebo (excipientes más 500 mg de fructosa y aromatizantes). El placebo y la Fórmula F eran idénticos en apariencia.

[0104] Todos los tratamientos se administraron durante un periodo de 6 meses.

[0105] El principal parámetro era la medida del OS utilizando el ensayo d-ROM en plasma [Cesarone MR, Belcaro G, Carratelli M, et al. A simple test to monitor oxidative stress, Int Angiol 1999;18:127-130.

[0106] Comelli U, Terranova R, Luca S, et al. Bioavailability and antioxidant activity of some food supplements in men and women using the d-ROMs test as a marker of oxidative stress. J Nutr 2001; 131 :3208-3211].

[0107] HCy, Se registró el GSH y el número de EF como parámetros secundarios. Se registró también la evaluación de MMSE II como parámetro secundario.

55 Valores de laboratorio y escalas de calificación

[0108] Durante las evaluaciones se extrajo sangre tras el ayuno durante la noche anterior, en tubos con heparina y sin heparina. Se recogieron alícuotas de 5 ml (2 de plasma y 1 de suero) de la vena braquial. La sangre recogida se centrifugó inmediatamente y se mantuvo a -80 °C hasta que se necesitó para las medidas. Se recogió una cuarta alícuota de 2 ml, sin heparina, para el análisis de la EF.

[0109] Los ensayos d-ROMs [Cornelli U, Terranova R, Luca S, et al. Bioavailability and antioxidant activity of some food supplements in men and women using the d- ROMs test as a marker of oxidative stress. J Nutr 2001;131 :3208-3211], erythrocyte GSH [Reid M, Badaloo A, Forrester T, Jahoor F. In vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in adults with sickle cell disease. Am J Physiol Endocrinol Metab.2006;291 :E73-E79] y HCy [Bleie O, Refsum H, Ueland PM et al. Changes in basal and post-methionine load concentration of total homocysteine and cystathionine

after B vitamin intervention. Am J Clin Nutr 2004; 80:641-648.] se evaluaron mediante métodos estandarizados. Los ensayos d-ROM se evaluaron en cada valoración mientras que los otros ensayos se evaluaron solo en las evaluaciones basales y a los 6 meses.

5 **[0110]** Se llevaron a cabo las medidas de los EF aislando el aglomerado de eritrocitos mediante centrifugación (100 x g durante 15 minutos a 4°C) y diluyendo este en 2 ml de una solución de citrato-fosfato-dextrosa con adenina (CPDA), a continuación se centrifugó una vez más. Tras la centrifugación, se retiró la parte superior de la solución y el proceso se repitió tres veces resuspendiendo siempre con CPDA.

10 **[0111]** Inmediatamente después de la última preparación, se calculó el porcentaje de EF utilizando un microscopio con óptica Nomarski basándose en el análisis de 400 eritrocitos [Mohanty JG, Eckley DM, JD Williamson et al. Do red blood cell-β-amyloid interaction alter oxygen delivery in Alzheimer's disease? Adv Exp Med Biol 2008;614:29-35.]

15 **[0112]** Se llevó a cabo la evaluación de MMSE II durante el periodo basal y después de 3 y 6 meses, no más de un día después de la extracción de sangre. Se registró una variación de al menos 1 punto de MMSE con respecto al valor basal siendo clínicamente como una mejora o un deterioro. Se midió la calidad del sueño de acuerdo con una escala semicuantitativa (sin cambio, mejora, deterioro).

20 **[0113]** Se determinó el tamaño de la muestra sobre la base de los ensayos d-ROM, que es una medida del OS. Los ensayos preliminares en abierto sobre pacientes que padecían EA dos meses después del tratamiento antioxidante se dirigieron a la extensión de posibles variaciones. En estos ensayos se observó una reducción de al menos 70-80 ± 10 (desviación estándar o SD) U. CARR correspondiendo a una reducción/aumento del 20 % sobre los valores basales. En las fluctuaciones del grupo no tratado de 20 ± 10 U. CARR. se observaron que correspondían a no más de una reducción/aumento del 5 % sobre los valores basales.

25 **[0114]** Considerando que $\alpha=0,05$ y $1-\beta=0,9$, son suficientes grupos de 20 sujetos para obtener una capacidad discriminativa de $>0,9$. Asimismo, permitiendo una retirada máxima del 30 %, se decidió alistar 26 sujetos por grupo. Para cada variable se calcularon los promedios ± SD.

30 **[0115]** Se determinaron las diferencias entre los grupos sobre la base del test de la t para datos independientes e interdependientes. Además, se calcularon los coeficientes de correlación entre las variables bajo examen. Para determinar las diferencias entre las frecuencias de mejora/deterioro observadas en los dos grupos, se empleó el test de la chi cuadrado exacto de acuerdo con Fisher.

35 *Resultados*

[0116] Solo 48 de los 52 pacientes iniciales completaron el ensayo; 23 casos se trataron con la Fórmula F y 25 casos se trataron con placebo. En la tabla 2 se proporcionan las características generales de los pacientes.

40 Tabla 2 Características de los pacientes tratados con Fórmula F o con Placebo

Variabes	Fórmula F	Placebo	p
Sexo	9 varones; 14 mujeres	10 varones; 15 mujeres	ns
Edad	75 ± 4,2	74 ± 4,9	ns
Hipertensión	6	5	ns
NIDD	6	5	ns
PMI	5	6	ns
Dislipidemia	6	6	ns
ApoE ε 4 ^a	4	5	Ns

NIDD = diabetes no dependiente de insulina; PMI = infarto de miocardio previo (al menos 3 años antes). Algunos pacientes se vieron afectados también por otras patologías (urológicas/ginecológicas), pero su frecuencia fue demasiado baja para ser discriminativa. P = test de la chi cuadrado con la corrección de Yates o el test de la t para datos independientes; ns = p > 0,05.

^a Al menos un alelo ε 4

[0117] El tratamiento antioxidante fue muy bien tolerado y no se observaron efectos secundarios notables. El cumplimiento terapéutico fue excelente en ambos grupos.

45 **[0118]** No hubo cambio relevante en cualquiera de las enfermedades concomitantes (hipertensión, diabetes tipo II, dislipidemia) como resultado de los tratamientos, ni hubo variaciones mayores en la calidad del sueño observada.

[0119] La Tabla 3 proporciona valores para el análisis de laboratorio: datos basales y datos después de 6 meses de tratamiento.

Tabla 3 Valores de laboratorio en pacientes que padecen EA,

Variable	Periodo	Fórmula F	Placebo
Prueba d-ROMs [U.CARR.]	Basal	380 ± 44,6	365 ± 37,8
	6 meses	395 ± 26,3 ^{ab}	356 ± 40,2
HCy µmol/l	Basal	27 ± 5,4	29 ± 5,9
	6 meses	20 ± 2,9 ^{ab}	27 ± 2,3
GSH µmol/l	Basal	2,6 ± 0,72	2,9 ± 0,84
	6 meses	3,2 ± 0,82 ^a	3,0 ± 0,79
%EF	Basal	18 ± 4,4	20 ± 4,2
	6 meses	12 ± 3,8 ^{ab}	17 ± 3,7 ^a

Se proporcionan los valores como promedio ± DS;
^a test de la t p < 0,05 para datos interdependientes (basales vs 6 meses);
^b test de la t p < 0,05 para datos independientes (Fórmula F vs placebo a los 6 meses);
 Para el grupo tratado con la Fórmula F la medida se relacionó solo con 20 sujetos.

5 [0120] Se observó la reducción en el OS solo en pacientes tratados con la Fórmula F. El número de EF se redujo incluso en el grupo tratado con placebo. preferentemente como un efecto del donepezilo, pero el efecto sobre esta variable es significativamente mayor (p < 0,05) tras el tratamiento con la Fórmula F.

[0121] Las medidas relativas a MMSE II en los datos basales a continuación después de 3 y 6 meses se recogen en la tabla 4.

10 Tabla 4. MMSE II en los dos grupos de pacientes: valores promedio ± SD

Tratamiento	Periodo	MMSEII	Casos mejorados/deteriorados
donepezilo + Fórmula F	Basal	23,2 ± 1,14	
	3 meses	24,0 ± 1,57	4/0
	6 meses	24,3 ± 1,43	11 ^a /1
donepezilo + placebo	Basal	23,9 ± 1,04	
	3 meses	23,6 ± 1,11	0
	6 meses	24,2 ± 1,28	4/2

^a Chi cuadrado exacta (Fisher) p < 0,05 (Fórmula F vs placebo)

[0122] Se observó una mejora en el promedio de MMSE II en ambos grupos.

15 [0123] Sin embargo, en casos individuales, se observó una mejora en MMSE II (≥ + 1) en 12 casos tratados con Fórmula F y solo en 4 casos tratados con placebo. Esta diferencia es significativa de acuerdo con el test de Fisher (p < 0,05).

20 [0124] Se registró una única reducción en MMSE II (≤ + 1) en el grupo tratado con antioxidante y en dos de los casos tratados con placebo.

[0125] Se calcularon los coeficientes de correlación entre diferentes variables para el grupo tratado con la Fórmula F (Tabla 5) basándose en las diferencias entre los valores de 6 meses y los valores basales.

25 [0126] No fue posible el mismo cálculo para el grupo tratado con placebo debido al limitado número de mejoras.

Tabla 5. Coeficientes de correlación para todas las variables del grupo tratadas con la Fórmula F

Variable	MMSE II	Prueba d-ROMS	HCy	EF	GSH
MMSE	1				
Prueba d-ROMS	0,38	1			
HCy	0,242	-0,194	1		
EF ^a	0,816 ^b	0,489 ^c	0,179	1	
GSH	0,881 ^b	0,499 ^c	0,307	0,621 ^b	1

^a El valor se refiere solo a 20 casos; p < 0,01; ^b p < 0,05

[0127] Se observaron algunas correlaciones significativas entre las diferencias en los valores de MMSE II (valores a los 6 meses-valores basales) y la reducción de los EF. El aumento en GSH se correlacionó también con la mejora del MMSE II. La reducción del ensayo d-ROM se correlacionó con la reducción de los EF y GSH aumentado.

5 **[0128]** La reducción en los EF y el aumento en GSH se mostró que estaban muy correlacionados ($p < 0,01$).

[0129] Se evaluaron todas las variables para determinar posibles correlaciones de los datos basales combinando los valores de los dos grupos, pero no se encontró que la correlación fuera significativa. Esto indica que el tratamiento con la Fórmula F ha dado como resultado diferencias significativas, debido a que con donepezilo solo no hubo dichas correlaciones.

10

[0130] Sobre la base de estos resultados se pueden extraer las siguientes conclusiones.

[0131] Se ha mostrado que el tratamiento con la Fórmula F reduce el OS y mejora los efectos clínicos del donepezilo.

15

[0132] Los datos que demuestran la reducción de los EF son sorprendentemente significativos. Como se ha mencionado anteriormente, la deformación eritrocítica que da como resultado los EF puede estar correlacionada con la presencia de sustancia amiloide [Mohanty JG, Eckley DM, JD Williamson et al. Do red blood cell- β -amyloid interaction alter oxygen delivery in Alzheimer's disease? *Adv Exp Med Biol* 2008; 614:29-35.

20

[0133] Singer SJ, Dewji NN. Evidence that Perutz's double- β -stranded subunit structure for β -amyloid also applies to their channel-forming structures in membranes. *PNAS* 2006; 103: 1546-1550.] que altera la liberación de O_2 en el cerebro.

25

[0134] Tras el tratamiento con la Fórmula F, el transporte de O_2 mejoró debido a que los eritrocitos tienden a resumir su forma y deformabilidad normales en la extensión de la reserva de antioxidante aumentada (GSH eritrocítico) con un efecto positivo sobre la microcirculación.

[0135] La funcionalidad aumentada de los eritrocitos les permite transportar eficazmente el amiloide derivándolo del tejido cerebral y no liberarlo en la microcirculación cerebral.

30

[0136] Este efecto es importante de forma exacta por los elevados niveles de sustancia amiloide que se deposita en la microcirculación cerebral que aparecen incluso antes de que los síntomas de la EA se vuelvan evidentes.

35

[0137] En conjunto, se encontró que el aumento en los niveles de GSH era proporcional a la reducción en los EF, habiéndose probado que ambas variables están correlacionadas con la mejora del MMSE II.

[0138] Sin embargo, la medida del GSH es exclusivamente una variable bioquímica, mientras que la de los EF es puramente funcional. Podría surgir también un aumento en el GSH sin ningún cambio en los EF.

40

[0139] La combinación de los dos efectos observados con las composiciones de la presente invención indica por tanto una mejora sustancial en la capacidad y la funcionalidad antioxidante, es decir, la disponibilidad del O_2 en el cerebro, que da como resultado un efecto favorable sobre las funciones cognitivas y conductuales.

45

[0140] Donepezilo como tal ha producido también una mejora en los EF probablemente en proporción a la producción reducida de sustancia amiloide cerebral, un efecto conocido de los inhibidores de la colinesterasa [Setzer B. Donepezil an update. *Expert Opin Pharmacother* 2007;8:1011-1023.] La adición de la composición F tiene dicho efecto significativamente amplificado, confirmando la relación entre la funcionalidad de los eritrocitos y la mejora clínica.

50

[0141] Cuando se llevaron a cabo las correlaciones entre las variables examinadas en el periodo basal (es decir, en el momento cuando todos los sujetos estaban recibiendo solo tratamiento con donepezilo) no se encontró correlación entre las variables; es decir, MMSE II, HCY, dROM, GSH, EF no estaban correlacionados tanto en los dos grupos. como en los grupos en su conjunto.

55

[0142] A la finalización del ensayo, surgieron algunas correlaciones que relacionaban solamente el grupo tratado con la composición F. Esto indica que la Fórmula F fue responsable de los efectos sobresalientes.

[0143] La reducción en HCY parece también ser importante en la mejora global de la función de los eritrocitos, a pesar de no tener impacto directo sobre los EF.

60

[0144] En conclusión, se estableció que la combinación específica de antioxidantes y las proporciones específicas utilizadas en la composición F consiguen el efecto de mejorar sustancialmente la situación general del OS cerebral, afectando de forma particular e inesperada a los EF.

65

- 5 **[0145]** Los resultados obtenidos indican que la composición F es un modo de evitar y retrasar los efectos de la demencia senil en todos los sujetos con factores de riesgo para la EA (vinculados en concreto a la edad) incluso si los síntomas no son aun clínicamente evidentes. Nunca se ha logrado limitar el riesgo oxidativo relacionado con la edad con una elevada dosificación de administración de antioxidantes: ni siquiera se ha verificado efecto alguno sobre el inicio y el progreso de la EA [Gray SL, Anderson ML, Crane PK et al. Antioxidant vitamin supplement use and risk of dementia or Alzheimer's disease in older adults. *J Am Geriatr Soc* 2008;56:291-295].
- 10 **[0146]** Malouf M, Grimley EJ, Areosa SA. Folic acid with or without vitamin B12 for cognition and dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;4:CD004514.] y, por el contrario, se han notificado efectos negativos sobre otras patologías crónicas [Aisen PS, Schneider LS, Sano M et al. High-dose B vitamin supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008;300:1774-1783]. Además, La composición F ha mostrado claramente mejorar el estado clínico cerebral en pacientes tratados con donepezilo, mientras que las combinaciones de este fármaco con otros antioxidantes ensayados anteriormente no han dado resultados positivos [Jatoi A, Kahanic SP, Frytak S et al. Donepezil and Vitamin E for preventing cognitive dysfunction in small cell lung cancer patients: preliminary results and suggestions for future study design. *Support Care cancer*, 2005; 13:66-69].
- 20 **[0147]** Para demostrar si uno cualquiera del grupo antioxidante que constituye la nueva composición de la invención era específica y principalmente responsable de la actividad inesperada de los eritrocitos alterados (EF), se llevaron a cabo algunos experimentos en sujetos de la tercera edad que padecían una EA probable leve.
- 25 **[0148]** Se analizaron 32 casos de demencia probable leve (MMSE II>26) (ADp) de acuerdo con los criterios NINCDS-ADRDA Drackman Da, Folstein M et al Clinical diagnosis of Alzheimer's disease:-report of the NINCDS-ADRDA work group under auspices of department of Health and Human Services task force on Alzheimer's disease. *Neurology*, 1984;34:939-944,
- 30 **[0149]** Roman GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T et al. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies: report of the NINDS-AIREN international Workshop. *Neurology* 1993;43:250-260].
- [0150]** Los criterios de inclusión eran: a) sujetos de ambos sexos de una edad > 60 años; b) en tratamiento con donepezilo durante al menos dos meses a una dosis de 5 mg (para la homogeneidad del tratamiento base).
- [0151]** Los criterios de exclusión eran: a) patologías crónicas diferentes que la ADp sin controlar terapéuticamente; b) ausencia de cuidadores que asegurarían la ingestión de los productos que se van a ensayar.
- 35 **[0152]** Se dividió a los sujetos aleatoriamente en cuatro grupos compuesto cada uno por 8 sujetos (4 varones y 4 hembras) y se siguió un esquema experimental de tres periodos de ensayo.
- 40 **[0153]** En el primer periodo, cada grupo se sometió a uno de cuatro tratamientos diferentes que tienen un efecto antioxidante, tanto directo como indirecto, durante un periodo de 2 semanas.
- [0154]** En el segundo periodo de ensayo se administró a los cuatro grupos un tratamiento de placebo durante un periodo de 15 días.
- 45 **[0155]** En el tercer periodo de ensayo, todos los sujetos (32 en total) habían experimentado un tratamiento representado por una combinación de formulaciones A+B+C evaluadas por separado en el primer periodo experimental (la formulación D formaba parte ya de la formulación A).
- [0156]** De esta manera, la acción de los tratamientos individuales podría compararse con la de los tratamientos combinados.
- 50 **[0157]** Se insertó el placebo en ampollas idénticas a las de los antioxidantes.
- [0158]** Se asignaron los tratamientos con Fórmula A, B, C o D aleatoriamente a los sujetos. Cuando los pacientes se sometieron a ensayos de evaluación (basales y tratamientos posteriores) se proporcionaron en un envase que contenía 20 ampollas, identificado solo con el número del sujeto y el periodo de tratamiento (15-30-45).
- 55 **[0159]** Se evaluaron los siguientes grupos antioxidantes (véase la Tabla 6).
- 60 a) un grupo de vitaminas B capaz de reducir los niveles de homocisteína y de activar el ciclo de las pentosas fosfato en las células en circulación (particularmente, pero no solo, en los glóbulos rojos (RBC)).
- b) una combinación de carnosina, Ginkgo biloba y coenzima Q₁₀ capaz de proteger las proteínas cerebrales de la oxidación producida por el amiloide (carnosina) y para permitir el suministro de sangre mejorado de los microvasos cerebrales (Ginkgo biloba) y la función mitocondrial mejorada (Coenzima Q₁₀).
- 65 c) una combinación de vitamina E, vitamina C, Se y L-cisteína que son los antioxidantes clásicos que actúan de manera coordinada para la regeneración de la vitamina E y para la síntesis de GSH.
- d) una combinación de únicamente las vitaminas B₆, B₉ y B₁₂.

[0160] El esquema experimental permitió la evaluación de si, y para que se analizó la variable, el efecto de la combinación fue mayor que el efecto de las formulaciones individuales que se van a evaluar.

5 **[0161]** Se determinó el estrés oxidativo con los d-ROM [Cornell U., Terranova R, Luca S. et al. Bioavailability of some food supplementation in man and women using d-ROMs test as a marker for oxidative stress. J Nutr 2001;131:3208-3211] (measurement of plasma levels of hydroperoxides), erythrocytic GSH according to [Reid M., Badaloo A, Forrester T, Jahoor F. In Vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in adults with sickle cell disease. Am J Physiol Endocrinol Metab.2006;291 :E73-E79], homocysteine according to [Bleie O, Refsum H, Ueland PM et al. Changes in basal and postmethionine load concentration of total homocysteine and cystationine after B vitamin
10 intervention. Am J Clin Nutr 2004; 80:641-648] and morphological evaluation of RBCs by microscopy as described by [Mohanty JG, Eckley DM, JD Williamson et al. Do red blood cell- amyloid interaction alter oxygen delivery in Alzheimer's disease? Adv Exp Med Biol 2008; 614:29-35.]

15 **[0162]** En la siguiente tabla se proporcionan las composiciones de las formulaciones (a) (b) (c) y (d), bajo (A) (B) (C) y (D).

Tabla 6. Contenidos de las cuatro formulaciones diferentes y la CDR relativa (cantidad diaria recomendada)

Formulación A	CDR	Formulación B	CDR	Formulación C	CDR	Formulación D	CDR
Vit B ₁ 1,4 mg	100	Carnosina 100 mg	-	Vit E 20 mg (racémico)	200	Vit B ₆ 1,7 mg	100
Vit B ₂ 1,6 mg	100	Ginkgo biloba 25 mg	-	Vit C 30 mg	50	Vit B ₉ 0,2 mg	100
Vit B ₃ 16 mg	100	Coenzima Q10 10 mg	-	Se 27,5 mcg	50	Vit B ₁₂ 2 mcg	100
Vit B ₆ 1,7 mg	100			L-cisteína 10 mg			
Vit B ₉ 0,2 mg	100						
Vit B ₁₂ 2 mcg	100						

20 **[0163]** En la Tabla 7 se proporcionan los resultados de la determinación del ensayo d-ROM, GSH eritrocítico, homocisteína y RBC fusiformes, antes y después de un periodo de tratamiento de 15 días con las cuatro combinaciones de antioxidantes.

Tabla 7. Valores para el ensayo d-ROM, GSH eritrocítico y porcentaje de RBC fusiformes antes y después del tratamiento con formulaciones A, B, C y D (valores promedio ± SD) en grupos de 8 sujetos en cada

Variables y tiempos	A	B	C	D
d-ROMS [U.CARR]				
Basal	363 ± 42,1	385 ±30,9	379 ±22,7	361 ±35,1
15 días	370 ± 33,6	383 ±33,1	357 ±35,8	361 ±29,3
Erythrocytic GSH				
Basal	1,6 ± 0,53	1,5 ±0,42	1,7 ±0,37	1,7 ±0,37
15 días	1,8 ± 0,52 ^a	1,6 ±0,38	1,6 ±0,33	1,7 ±0,47
Homocisteína [mol/l]				
Basal	18,6 ± 1,77	19,1 ±3,02	17,4 ±2,97	17,3 ±2,82
15 días	16,8 ± 1,83 ^a	18,5 ±1,83	17,1 ±2,34	17,1 ±2,22
RBC fusiformes [%]				
Basal	14,5 ± 2,07	12,3 ±2,55	15,1 ±2,90	15,4 ±1,92
15 días	14,0 ±2,07	12,9 ±2,42	14,6 ±2,26	14,9 ±2,59

a= test de la t para datos interdependientes p < 0,05.

25 **[0164]** Estos datos muestran que la formulación A produjo un aumento ligero pero significativo en el GSH eritrocítico y una reducción en la homocisteína; la formulación C produjo una ligera pero significativa reducción en el OS: en ningún caso hubo cambios en el número de RBC fusiformes notificado.

30 **[0165]** La tercera fase de ensayo posterior (después de un periodo de lavado de 15 días) se llevó a cabo con la formulación resultante de combinar las formulaciones A+B+C, proporciona los resultados que se muestran en la tabla 8 a continuación.

[0166] Tabla 8. Valores para el ensayo d-ROM, el GSH eritrocítico, la homocisteína y los RBC fusiformes antes y después del tratamiento con los productos combinados contenidos en las formulaciones A, B, C (valores promedio \pm SD) en grupos de 32 sujetos en cada.

Variables y tiempos	Formulación A + B + C
d-ROMS [U CARR]	
Basal	386 \pm 23,2
15 días	313 \pm 18 ^a
Erythrocytic GSH	
Basal	1,6 \pm 0,39
15 días	2,1 \pm 0,47 ^a
Homocisteína [mol/l]	
Basal	18,2 \pm 2,51
15 días	16,3 \pm 2,22 ^a
RBC fusiformes [%]	
Basal	14,0 \pm 2,11
15 días	9,4 \pm 1,87 ^a
a = test de la t para datos interdependientes P > 0,05	

5

[0167] Estos datos muestran que el tratamiento con la composición derivada de combinar todos los antioxidantes en los grupos (a) (b) y (c) dieron como resultado diferencias significativas en todos los parámetros

[0168] Sorprendentemente, es también significativamente reducida la presencia de RBC fusiformes.

10

[0169] Este resultado era absolutamente inesperado, considerando que no hubo respuesta de ningún tipo con los grupos individuales de antioxidantes que actúan sobre el OS.

15

[0170] Ni en la técnica conocida, existe ninguna indicación de antioxidantes capaces de contribuir a una mejora significativa en la condición de los RBC.

20

[0171] Los resultados obtenidos de forma inequívoca muestran que para proteger la funcionalidad de los RBC en individuos que padecen de EA, no es suficiente reforzar las defensas antioxidantes propias de los RBC, sino que debe reducirse el OS cerebral con antioxidantes específicos para evitar que el tejido cerebral transfiera este mediante propagación a los RBC.

25

[0172] El concepto completamente nuevo que forma la base de la presente invención es que es necesario para reforzar los RBC contra su propio OS y para reducir simultáneamente la cantidad de OS que se deriva de su contacto con el tejido cerebral oxidado.

30

[0173] Las nuevas composiciones de los antioxidantes cerebrales de la presente invención han conseguido este objeto y constituyen una etapa crucial hacia la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Bibliografía

30

[0174]

1) Hawkins BT, Davis T. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 2005; 57:173-185.

35 2) Wang J, Xiong S, Xie C et al. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2005;93:953-962

3) Ding Q, Dimayuga E, Keller JN. Oxidative damage, protein synthesis, and protein degradation in Alzheimer's disease. *Curr Alzh Res* 2007;4:73-79

40 4) Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006;433:787-795.

5) Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res* 2007;35:7497- 7504.

45 6) Zhu X, Smith MA, Honda K et al. Vascular oxidative stress in Alzheimers disease. *J Neurol Sci* 2007;257:240-246.

7) Dröge W, Schipper MH. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell* 2007;6:361-370.

8) Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71 (supl):621S-629S.

- 9) Hachinski V, Munoz DG. Cerebrovascular pathology in ALZHEIMER'S DISEASE: cause, effect or epiphenomenon? *Ann N Y Acad Sci* 1997;826:1-6.
- 10) Smith MA, Vasak K, Knipp M et al. Dimethylargininase, a nitric oxide regulatory protein, in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 1998; 25:898-902.
- 5 11) Luth HJ, Munch G, Gartner U et al. Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesions in rats: evidence for an induction by amyloid pathology. *Brain Res* 2001; 913:57-67.
- 12) Heneka MT, Wiesinger H, Dumitrescu-Ozimek L et al. Neuronal and glial coexpression of arginosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:906-916.
- 10 13) Lee SC, Zhao ML, Hirano A, Dickson DW. Inducible nitric oxide synthase immunoreactivity in the Alzheimer disease hippocampus: association with Hirano bodies, neurofibrillary tangles, and senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58:1163-1169.
- 14) Soneja A, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmac Report* 2005; 57:108-119.
- 15 15) Malinski T. Nitric oxide and nitroxidative stress in ALZHEIMER'S DISEASE. *J Alzheimers Dis* 2007; 11 :207-218.
- 16) Tagliavini F, Ghiso J, Timmers WF et al. Coexistence of Alzheimer's amyloid precursor protein and amyloid protein in cerebral vessel walls. *Lab invest* 1990; 62:761-767.
- 17) Mohanty JG, Eckley DM, JD Williamson et al. Do red blood cell-amyloid interaction alter oxygen delivery in Alzheimer's disease? *Adv Exp Med Biol* 2008;614:29-35.
- 20 18) Singer SJ, Dewji NN. Evidence that Perutz's double-stranded subunit structure for amyloid also applies to their channel-forming structures in membranes. *PNAS* 2006; 103: 1546-1550,
- 19) Engström I, Ronquist G, Petterson L, Waldenstrom A. Alzheimer amyloid beta-peptides exhibit ionophore-like properties in human erythrocytes. *Eur J Clin invest* 1995;25:471-476.
- 25 20) Ravi LB, Mohanty JG, Chrest FJ et al. Influence of beta-amyloid fibrils on the interactions between red blood cells and endothelial cells. *Neurol Res* 2004;26:579-585.
- 21) Alhamdani MSS. Impairment of glutathione biosynthetic pathway in uremia and dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20: 124-128.
- 22) Reid M, Badaloo A, Forrester T, Jahoor F, in vivo rates of erythrocytes glutathione synthesis in adults with sickle cell disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291 :E73-E79.
- 30 23) Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive species. *Biochemistry (Moscow)* 2005;70:200-214
- 24) Sas K, Robotka H, Toldi J, Vecsei L. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci* 2007;257:221-239.
- 35 25) Marlatt M, Lee H, Perry G et al. Sources and mechanism of cytoplasmic oxidative damage in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp*. 2004;64:81-87.
- 26) Hirai K, Aliev G, Nunomura A et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2001;21 :3017-3023.
- 27) Mecocci P, Polidori MC, Cherubini A et al. Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2002;59:794-798.
- 40 28) Stewart PA, Hayakawa K, Akers MA, Vinters HV. A morphometric study of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease *Lab invest* 1992;67:734-742.
- 29) Blass JP, Gibson GE. The role of oxidative abnormalities in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Rev Neurol (Paris)* 1991;147:513-525.
- 45 30) Metcalfe DD, Thompson HL, Klebanoff SJ, Henderson WR. Oxidative degradation of rat mast-cell proteoglycan. *Biochem J* 1990;272:51-57.
- 31) Roberts CR, Roughley PJ, Mort JS. Degradation of human proteoglycan aggregates induced by hydrogen peroxide. *Biochem J* 1989;259:805-811.
- 50 32) Guioetto A, Calderan A, Ruzza P, Borin G. Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review. *Curr Med Chem* 2005;12:2293-2315.
- 33) Hipkiss AR, Brownson C, Carrier MJ. Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. *Mech Ageing Dev* 2001;122:1431-1445.
- 34) Brownson C, Hipkiss AR. Could carnosine or related structures suppress Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 2007; 11 :229-24
- 55 35) Koltermann A, Harkom A, Koch E et al. Ginkgo biloba extract Egb 761 increases endothelial nitric oxide production in vitro and vivo. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:1715-1722.
- 36) Napryeyenko O, Borzenko I, GINDEM-NP Study group. Ginkgo biloba special extract in dementia with neuropsychiatric features. A randomized placebo-controlled double-blind clinical trial. *Arzneimittelforschung* 2007;57:4-11.
- 60 37) Mazza M, Capuano A, Bria P, Mazza S. Ginkgo biloba and donepezil: a comparison in the treatment of Alzheimer's dementia in a randomized placebo-controlled double-blind study. *Eur J Neurol* 2006;13:981-985.
- 38) Seshadri S, Beiser A, Selhub J et al. Plasma homocysteine as risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *NEJM* 2002;346:476-483.
- 39) Ravaglia G, Forti P, Maioli F et al. Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 2005;82:636-643.
- 65 40) Babiloni, C, Bosco P, Ghidoni R et al. Homocysteine and electroencephalographic rhythms in Alzheimer's

- disease. *Neuroscience* 2007;145, 942-954.
- 41) Pogribna M, Melnik S, Pogribni I, Chango et al. Homocysteine metabolism with Down Syndrome: in vitro stimulation. *Am J Human Genet* 2001;69:88-95.
- 5 42) Selkoe DJ. Normal and abnormal biology of the β -amyloid precursor protein. *Annu Rev Neurosci* 1994; 17 :489-517.
- 43) Naslund J, Haroutonian V, Mohs R et el. Correlation between elevated levels of amyloid β -peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 2000;283:1571- 1577.
- 44) Kontush A. Amyloid -beta: an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. *Free Rad Biol Med* 2001;31 :1120- 1131.
- 10 45) Butterfield DA. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implication for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Rad Res* 2002;36:1307-1313.
- 46) Suo Z, Su G, Kundtz A et al. A beta vasoactivity in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 2000;903:156-163.
- 47) Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ et al. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 2005;8:79-84.
- 15 48) Walsh DM, Selkoe DJ. Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept Lett* 2004; 11 :213-228.
- 49) Bleie O, Refsum H, Ueland PM et al. Changes in basal and postmethionine load concentration of total homocysteine and cystathionine after B vitamin intervention. *Am J Clin Nutr* 2004;80:641-648.
- 20 50) Lee BJ, Huang MC, Chung LJ et al. Folic acid and vitamin B12 are more effective than vitamin B6 in lowering fasting plasma homocysteine concentration in patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:481-487.
- 51) NcKinley MC, McNulty H, McPartlin J et al. Low-dose vitamin B6 effectively lowers fasting homocysteine in healthy elderly person who are folate and riboflavin replete. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:759-764.
- 25 52) Bønaa KH, Njølstad NJ, Ueland PM et al. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *NEJM* 2006;354:1578- 1588.
- 53) Ebbing M, Bleie O, Ueland PM et al. Mortality cardiovascular events in patients treated with homocysteine-lowering B vitamin after coronary.
- 30 54) Jatoi A, Kahanic SP, Frytak S et al. Donepezil and Vitamin E for preventing cognitive dysfunction in small cell lung cancer patients: preliminary results and suggestions for future study design. *Support Care cancer*. 2005;13:66-69.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición farmacéutica que comprende carnosina, tiamina, riboflavina, nicotinamida, piridoxina, ácido fólico, cianocobalamina, vitamina C, vitamina E, coenzima Q₁₀, β-caroteno, selenio, L-cisteína y extracto de Ginkgo biloba.
- 10 **2.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende 40 a 50 % en peso de carnosina, 0,5 a 1 % en peso de tiamina, 0,5 a 1 % en peso de riboflavina, 5 a 12 % en peso de nicotinamida, 0,6 a 1,4 % en peso de piridoxina, 10 a 20 % en peso de vitamina C, 5 a 12 % en peso de vitamina E, 1 a 7 % en peso de coenzima Q₁₀, 0,5 a 5 % en peso de β-caroteno, 1 a 7 % en peso de L-cisteína, 8 a 15 % en peso de extracto de Ginkgo biloba.
- 15 **3.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende 42 a 45 % en peso de carnosina, 0,6 a 0,8 % en peso de tiamina, 0,6 a 0,8 % en peso de riboflavina, 6 a 10 % en peso de nicotinamida, 0,8 a 1,2 % en peso de piridoxina, 12 a 15 % en peso de vitamina C, 7 a 10 % en peso de vitamina E, 3 a 6 % en peso de coenzima Q₁₀, 1,5 a 3 % en peso de β-caroteno, 3 a 6 % en peso de L-cisteína, 10 a 13 % en peso de extracto de Ginkgo biloba.
- 20 **4.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en 44,5 a 45 % en peso de carnosina, 0,6 a 0,7 % en peso de tiamina, 0,65 a 0,75 % en peso de riboflavina, 7,5 a 9 % en peso de nicotinamida, 0,8 a 1 % en peso de piridoxina, 0,07 a 0,1 % en peso de ácido fólico, 0,0004 a 0,0007 % en peso de cianocobalamina, 13 a 14 % en peso de vitamina C, 8,5 a 9,5 % en peso de vitamina E, 4 a 5 % en peso de coenzima Q₁₀, 2 a 2,5 % en peso de β-caroteno, 0,01 a 0,02 % en peso de selenio, 4 a 5 % en peso de L-cisteína y 11 a 12 % en peso de extracto de Ginkgo biloba.
- 25 **5.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, que consiste en carnosina 100 mg, tiamina 1,4 mg, riboflavina 1,6 mg, nicotinamida 18 mg, piridoxina 2 mg, ácido fólico 200 μg, cianocobalamina 1 μg, vitamina C 30 mg, vitamina E 20 mg, coenzima Q₁₀ 10 mg, β-caroteno 800 RE, selenio 27,5 μg, L-cisteína 10 mg y extracto de Ginkgo biloba 25 mg.
- 30 **6.** Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 para prevenir, estabilizar y tratar la enfermedad de Alzheimer y las disfunciones cognitivas vinculadas a la anterior.
- 35 **7.** La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que los componentes individuales están presentes en una cantidad igual o inferior a la de la CDR (cantidad diaria recomendada).
- 40 **8.** La composición farmacéutica para uso de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, en el que una dosis unitaria de la composición farmacéutica comprende 90 a 110 mg de carnosina, 1,2 a 1,7 mg de tiamina, 1,4 a 1,8 mg of riboflavina, 14 a 24 mg de nicotinamida, 1 a 3 mg de piridoxina, 25 a 42 mg de vitamina C, 12 a 25 mg de vitamina E, 5 a 15 mg de coenzima Q₁₀, 2 a 9 mg de β-caroteno, 5 a 15 mg de L-cisteína, 20 a 32 mg de extracto de Ginkgo biloba.
- 45 **9.** La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha dosis unitaria de la composición farmacéutica consiste en carnosina 100 mg, tiamina 1,4 mg, riboflavina 1,6 mg, nicotinamida 18 mg, piridoxina 2 mg, ácido fólico 200 μg, cianocobalamina 1 μg, vitamina C 30 mg, vitamina E 20 mg, coenzima Q₁₀ 10 mg, β-caroteno 800 RE, selenio 27,5 μg, L-cisteína 10 mg y extracto de Ginkgo biloba 25 mg.
- 50 **10.** La composición farmacéutica para uso de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en el que dicha dosis unitaria de la composición farmacéutica se administra diariamente en una cantidad de 30 a 300 % dependiendo de la gravedad de la enfermedad a tratar.