

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **237891**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **423794**

(22) Data zgłoszenia: **08.12.2017**

(51) Int.Cl.

A61K 36/45 (2006.01)

A61K 36/73 (2006.01)

A61K 36/736 (2006.01)

A61K 36/28 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(54) **Kompozycja polifenolowa mająca zastosowanie w profilaktyce i wspomaganii leczenia chorób neurodegeneracyjnych zwłaszcza Alzheimerera**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

17.06.2019 BUP 13/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

14.06.2021 WUP 12/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
Lublin, PL**

**UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

ANNA BOGUCKA-KOCKA, Świdnik, PL

DOMINIK SZWAJGIER, Lublin, PL

KAMILA BOROWIEC, Łęczna, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Bełz

PL 237891 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja polifenolowa o działaniu polegającym na efektywnym ograniczaniu aktywności acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy, enzymów zaangażowanych w rozwój choroby Alzheimera, przeznaczona szczególnie do stosowania w profilaktyce i wspomaganiu leczenia chorób neurodegeneracyjnych, zwłaszcza choroby Alzheimera.

Znane preparaty roślinne stosowane w profilaktyce chorób neurodegeneracyjnych a zwłaszcza Ginkofar, Tanakan oparte są na naturalnych składnikach pochodzących z miłorzębu, głogu oraz żeńszenia.

Znane suplementy oparte są o sproszkowane komponenty o dużej zawartości substancji roślinnych balastowych jak frakcje błonnika pokarmowego (typu liście, korzeń itp.), zaś nasz preparat to wydzielone związki fenolowe (przez to skoncentrowane), stąd łatwiej dozować dokładną ilość związków polifenolowych do odpowiedniej postaci farmaceutycznej (želki, pastylki). Znany jest z opisu wynalazku JP2005104850 środek do profilaktyki choroby Alzheimera, zawierający polifenole. W dokumencie wskazano zastosowanie zaledwie kilka związków polifenolowych. Znany jest także z patentu PL228955 napój funkcjonalny zawierający: brzoskwinie lub morelę, żurawinę, aronię, borówkę i/lub owoce poziomki, i/lub maliny.

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie dotyczące składu kompozycji zawierającej około trzydziestu wykrytych związków polifenolowych z naturalnych składników.

Kompozycja polifenolowa według wynalazku zawierająca owoce brzoskwini, aroni, borówki, poziomki, maliny charakteryzuje się tym, że zawiera liście pietruszki (*Petroselinum crispum* L), zaś składniki naturalne z owoców brzoskwini (*Prunus persica* L), owoców aronii (*Aronia melanocarpa* L), owoców borówki czarnej (*Vaccinium myrtillus* L), owoców poziomki (*Fragaria vesca* L), owoców malin (*Rubus idaeus* L.) oraz liści pietruszki (*Petroselinum crispum* L.) występują w postaci wodnych ekstraktów w postaci zatężonej do 5%–10% początkowej ich objętości, przy czym każdy z ekstraktów występuje w ilości od 12,0 do 20,0 części wagowych.

Kompozycja zawiera dodatkowo wodny ekstrakt z owoców moreli (*Prunus armeniaca*) w ilości od 12,0 do 20,0 części wagowych i/lub z owoców żurawiny (*Oxycoccus*)-w ilości od 12,0 do 20,0 części wagowych.

Kompozycja o efektywnym ograniczaniu aktywności acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy, enzymów zaangażowanych w rozwój choroby Alzheimera jest przydatna w zapobieganiu wystąpienia chorób neurodegeneracyjnych, zwłaszcza Alzheimera a także innych chorób u podłoża których leży inny przewlekły stan zapalny i podwyższony potencjał oksydoredukcyjny. Ponadto jest przydatna we wspomaganiu leczenia tych chorób. Dostarczanie związków polifenolowych w diecie lub w roślinnych suplementach diety może zapobiegać takim następstwom jak m.in. choroba Alzheimera.

Nasz preparat ponadto wykazuje działanie przeciwutleniające oraz działanie przeciwzapalne. Działanie przeciwzapalne występuje z uwagi na stwierdzone występowanie około 30 wykrytych polifenoli.

Zastosowanie pojedynczych wyciągów z poszczególnych surowców, lub też zastosowanie mniejszej liczby surowców wyjściowych nie dostarczy takiej ilości związków fenolowych jak według wynalazku, który stanowi koncentrat związków polifenolowych w liczbie około 30, co daje wysoką skuteczność w profilaktyce i wspomaganiu leczenia chorób degeneracyjnych, zwłaszcza choroby Alzheimera.

Zawartość związków fenolowych w preparacie, pochodzących od każdego z surowców wynosi korzystnie $6,0 \text{ mg/cm}^3 \pm 1,0 \text{ mg}$, co daje w sumie $42 \text{ mg/cm}^3 \pm 7,0 \text{ mg}$.

Kompozycja według wynalazku oparta jest wyłącznie o naturalne składniki. Kompozycja zawiera około trzydzieści związków polifenolowych (oznaczonych jakościowo i ilościowo za pomocą cieczowej chromatografii wysokociśnieniowej z detekcją masową), które wykazują synergizm przez co dają wysoką skuteczność w profilaktyce i leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, zwłaszcza choroby Alzheimera.

Poszczególne ekstrakty (z indywidualnych surowców) pozyskuje się w prosty sposób (maceracja, ekstrakcja, tłoczenie - uzyskanie soku wspomaganie użyciem handlowych, przemysłowych preparatów enzymatycznych). Soki poddawane są następnie ultrafiltracji w celu skoncentrowania związków polifenolowych poprzez usunięcie substancji balastowych (głównie frakcje błonnika pokarmowego). Polifenole zawarte w ultrafiltracie są koncentrowane poprzez zagęszczanie pod obniżonym ciśnieniem, w niskiej temperaturze (ok. 35°C).

Będąca przedmiotem wynalazku kompozycja zawiera 29 zdefiniowanych związków polifenolowych (Tab. 1 i 2), będących inhibitorami cholinioesteraz, stosowanych w prewencji choroby Alzheimera, chorób układu krążenia oraz innych chorób neurodegeneracyjnych. Metoda pozyskiwania ultrafiltratu jest dobrze opracowana a sprzęt używany przemysłowo jest standardowy i szeroko dostępny.

Preparat otrzymuje się w następujący sposób. Naważkę każdego surowca zhomogenizować (np. w aparacie Thermomix, Vorwerk, Germany, lub podobnym) w temp. pokojowej (4 min, maks. prędkość), następnie do każdego surowca dodaje się po 5 dm³ wody i dalej homogenizowano przez 4 min. Próbkę odwirować (np. wirówka Sigma 4K15, Sigma Laboratory Centrifuges, Polygen, 30 min, 4°C, 9000 x g). Osad z każdego surowca homogenizować (Thermomix) z 2.5 dm³ wody, próbki wirować (30 min, 4°C, 9000 x g). Wszystkie supernatanty z danego surowca połączyć (ogółem ok. 15 dm³ z jednego surowca). Następnie, każdy supernatant poddać ultrafiltracji (4°C, kilka dni, membrana 0,2 µm; np. producent Sartorius Stedim, France). Próbkę po ultrafiltracji zagęścić w wyparce próżniowej (- 0,09 MPa, 35°C, kilkunastokrotne zagęszczenie), każdy z wyciągów wystandaryzować uzyskując stężenie związków fenolowych równe 42 mg/cm³ ± 7,0 mg/cm³. W celu uzyskania finalnej kompozycji polifenolowej zmieszano równe objętości każdego składowego wyciągu.

P r z y k ł a d 1

Otrzymana według wynalazku kompozycja zawierała wodne wyciągi z:

- z owoców brzoskwini w ilości 18 części wagowych
- z owoców poziomki w ilości 18 części wagowych
- z owoców aronii w ilości 18 części wagowych
- z owoców borówki czarnej w ilości 18 części wagowych
- z owoców malin w ilości 18 części wagowych
- z liści pietruszki w ilości 18 części wagowych

zateżone do 10% objętości początkowej. Preparat uformowano w postać żelków.

Kompozycja zawierała wyciągi pozbawione substancji balastowych w ilości około 70%.

P r z y k ł a d 2

Analogicznie jak w przykładzie pierwszym otrzymano kompozycję zawierającą wyciągi z wyżej opisanych składników w postaci stałej. W tym celu wyciągi scharakteryzowane w przykładzie pierwszym poddano procesowi suszenia rozpyłowego.

P r z y k ł a d 3

Otrzymana według wynalazku kompozycja zawierała wodne wyciągi z:

- z owoców brzoskwini w ilości 13 części wagowych
- z owoców poziomki w ilości 13 części wagowych
- z owoców aronii w ilości 13 części wagowych
- z owoców borówki czarnej w ilości 13 części wagowych
- z owoców malin w ilości 13 części wagowych
- z liści pietruszki w ilości 13 części wagowych
- z owoców żurawiny w ilości 13 części wagowych
- z owoców moreli w ilości 13 części wagowych

zateżone do 10% objętości początkowej. Preparat uformowano w postać żelków.

Kompozycja zawierała wyciągi pozbawione substancji balastowych w ilości około 70%. Analizy składu kompozycji polifenolowej dokonano przy użyciu wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej z detekcją, MS, UV-VIS i spektrofotometryczną.

P r z y k ł a d 4

Analogicznie jak w przykładzie trzecim otrzymano kompozycję zawierającą wyciągi z wyżej opisanych składników w postaci stałej. W tym celu wyciągi scharakteryzowane w przykładzie pierwszym poddano procesowi suszenia rozpyłowego.

Związki obecne w chromatogramach identyfikowano po czasach retencji autentycznych chromatograficznych wzorców związków fenolowych (Sigma-Aldrich; Fluka, USA; Extrasynthese, Francja; Roth, Niemcy; Apin Chemicals; Wlk. Brytania).

Następnie przeprowadzono jakościową i ilościową analizę kompozycji polifenolowej za pomocą chromatografii wysokociśnieniowej cieczowej z detekcją przy użyciu spektrometru mas. Związki wzorcowe użyte w badaniach: kwercetyna, naringina, kwas cytrynowy, kwas chlorogenowy, kwas protokatechowy, kwas p-kumarowy, kwas gentyzynowy i kwas rozmarynowy. Analizy ilościowe wykonano na podstawie pięciokrotnego wstrzyknięcia roztworów wzorcowych związków referencyjnych w pięciu róż-

nych stężeniach i pięciokrotnego wstrzyknięcia badanej próby. Wyniki przedstawiają średnie z odchyleniami standardowymi (Tab. 1). Kwercetynę użyto do identyfikacji pochodnych kwercetyny, zaś naringeninę do ilościowego określenia zawartości antocyjanów i glukozydów flawonoidowych ogółem, kwas p-kumarowy do określenia stężenia glukozydów p-kumarylowych, zaś analizę wolnych kwasów fenolowych przeprowadzono przy użyciu ok. 40 rzeczywistych wzorców wolnych kwasów fenolowych.

Chromatografia z detekcją UV-VIS i spektrofluorymetryczną. Przykładowe chromatogramy z rozdziału związków zawartych w wyciągu przedstawiono na rysunku Fig. 1 i 2, gdzie Fig. 1 przedstawia przykładowe chromatogramy przedstawiające związki zidentyfikowane w wyciągu (detekcja UV-VIS przy 280 nm i 520 nm), zaś Fig. 2 przykładowe chromatogramy przedstawiające związki zidentyfikowane w wyciągu (detekcja spektrofluorescencyjna przy 280 nm i 365 nm).

T a b e l a 1. Czasy retencji autentycznych wzorców HPLC i stężenia najważniejszych związków wykrytych w wyciągu.

Nr	Związek	Czas retencji (min)	Stężenie (mg/cm ³)
1	Kwas 3,4,5-trihydroksybenzoesowy (Kwas galusowy)	7,90	11,70
2	Kwas 3,4-di-OH-benzoesowy (Kwas protokatechowy)	25,57	1,87
3	Kwas 2,5-di-OH- benzoesowy (Kwas gentyzynowy)	26,81	5,62
4	Kwas 3-Cafeoylochinowy (Kwas chlorogenowy)	34,47	9,83
5	Kwas 4-OH-3-OCH ₃ -benzoesowy (Kwas wanilinowy)	36,04	2,12
6	(-)-Epikatechina	37,04	2,96
7	Kwas 4-OH-benzoesowy	37,61	1,08
8	Kwas 3,4-di-OH-cynamonowy (Kwas kawowy)	39,66	5,05
9	Kwas 4-OH-3,5-di-OCH ₃ -benzoesowy (Kwas syryngowy)	42,00	2,57
10	Kwas 4-OH-cynamonowy (Kwas p -kumarowy)	42,71	1,06
11	Kwas 4-OH-3-OCH ₃ -cynamonowy (Kwas ferulowy)	43,62	0,47
12	Cyjanidyno 3-glukozyd	44,11	10,40
13	Kwas elagowy	46,50	15,27
14	Pelargonidyno 3-O-glukozyd	47,07	5,58
15	Floretyno 2'-β-D-glukozyd (florydzyzna)	48,30	0,36
16	Kwas 2-OH-benzoesowy (Kwas salicylicyowy)	50,30	4,78
17	Kwercetyno 3-rutynozyd	51,00	3,32
18	Kwercetyno 3-glukozyd	52,30	3,00
19	Kwercetyna	53,15	3,68
20	Delfinidyna	54,91	4,60
21	Pelargonidyna	63,26	8,98

22	Kaempferol 3-rutynozyd	66,13	0,94
23	Kwas cynamonowy	67,43	0,10
24	Procyanidyna B2	70,60	1,79
25	Cyjanidyna	72,20	1,33
26	Kaempferol	74,12	0,45

Analiza HPLC-MS składników kompozycji polifenolowej

Przeprowadzono detekcję w spektrometrze masowym w celu identyfikacji 23 związków (Tabela 2) w wyciągu. Analiza ilościowa pozwoliła na określenie stężenia najważniejszych ilościowo związków w wyciągu (Tabela 3).

T a b e l a 2. Czasy retencji autentycznych wzorców HPLC i parametry fragmentacji najważniejszych związków wykrytych w wyciągu metodą HPLC z detekcją masową (MS).

<i>N r</i>	<i>Jon (+/-)</i>	<i>Czas retencji (min)</i>	<i>Formuła chemiczna</i>	<i>Eksperymentalne m/z</i>	<i>Wyliczone m/z</i>	<i>Delta (mmu)</i>	<i>RDB</i>	<i>Fragmenty MS/MS</i>	<i>Proponowany związek chemiczny</i>
1	-	4,8	C ₇ H ₆ O ₅	169,0153	169,0142	-6,19	5,0	-	Kwas galusowy
2	-	10,8	C ₇ H ₆ O ₄	153,0200	153,0193	-4,34	5,0	109, 91, 65	Kwas gentyzynowy
3	-	11,1	C ₇ H ₆ O ₄	153,0188	153,0193	3,46	5,0	109, 91, 65, 53	Kwas protokatechowy
4	-	14,0	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0877	353,0878	0,3	8,0	191, 179, 135	Kwas neochlorogenowy
5	-	15,5	C ₇ H ₆ O ₃	137,0245	137,0244	-0,6	5,0	108, 94, 91	Kwas m-hydroksybenzoesowy
6	-	16,5	C ₇ H ₆ O ₃	137,0245	137,0244	-0,6	5,0	120, 107, 93, 65	Kwas p-hydroksybenzoesowy
7	-	18,4	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0895	353,0878	-4,78	8,0	191, 161, 135	Kwas chlorogenowy
8	+	18,9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611,1613	611,1607	-1,05	13,0	565, 433, 287, 227, 116	Pochodna kaempferolu-3-soforozydu

9	+	19,2	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,1074	449,1078	0,98	12,0	287, 235, 145	Cyjanidyno 3-glukozyd
10	-	19,4	C ₈ H ₈ O ₄	167,0367	167,0350	-10,2	5,0	-	Kwas wanilinowy
11	-	20,3	C ₉ H ₈ O ₄	179,0360	179,0350	-5,65	6,0	135, 117, 89	Kwas kawowy
12	-	23,3	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367.1042	367.1035	-2.02	8.0	249, 191, 173, 93	Kwas 4-O-ferulochinowy
13	-	23,7	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325.0943	325.0956	-4.32	7.0	163, 119, 91, 71	p-kumarylo-glukozyd
14	-	24,5	C ₈ H ₈ O ₄	167.0349	167.0350	0.49	5.0	-	Kwas izowanilinowy
15	-	24,9	C ₉ H ₈ O ₃	163,0420	163,0401	- 11,78	6,0	119, 104, 93	Kwas kumarowy
16	+	25,1	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433.1147	433.1129	-4.11	12.0	365, 301, 229, 133	Pochodna kwercetyny
17	-	25,5	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359,0737	359,0772	9,83	11,0	197, 153, 135, 89	Kwas rozmarynowy
18	-	26,7	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193,0499	193,0506	3,77	6,0	-	Kwas ferulowy
19	+	27,4	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	437,1427	437,1442	3,49	10,0	-	Floretyno 2'-β-D-glukozyd (Florydzyzna)
20	-	28,4	C ₇ H ₆ O ₃	137,0241	137,0244	2,3	5,0	108, 93, 75, 65	Pochodna kwasu o-hydroksybenzoowego
21	-	28,7	C ₉ H ₈ O ₂	147,0439	147,0452	8,46	6,0	-	Kwas cynamonowy
22	+	30,7	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303,0508	303,0499	-2,88	11,0	285, 257, 229, 165, 153, 137	Kwercetyna
23	+	31,4	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	303,0489	303,0499	3,41	11,0	-	Delfinidyna
24	-	31,7	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	223,0633	223,0612	2,58	6,0	-	Kwas synapinowy
25	+	31,8	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	319,0456	319,0448	-2,38	11,0	-	Myricetyna

26	+	35,5	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465,1039	465,1028	-2,47	12,0	333, 303, 257, 165, 127	Kwercetyno 3-glukozyd (Izokwercetyna)
27	+	36,9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595,1613	595,1626	7,48	13,0	435, 398, 223, 287, 147	Kaempferol 3-rutynozyd
28	+	38,2	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂	479,1175	479,1190	1,89	12,0	-	Petunidyno glukozyd
29	+	43,4	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	597,1532	579,1497	-6,05	18,0	-	Procyjanidyna B2

T a b e l a 3. Ilościowa analiza wybranych związków wykrytych w wyciągu.

Związek	Jon (+/-)	Równanie kalibracyjne	Wartość R ²	Zidentyfikowany związek	% zawartość w próbce	SD
kwercetyna	+	$y = 53,760,657x + 8,171,143$	0,9949	Pochodna kwercetyny	0,85	0,064
				Izokwercetyna	1,97	0,11
Naringenina	+	$y = 52,263,581x + 637,745$	0,9984	Cyjanidyno 3-glukozyd	8,18	0,38
				Kaempferol rutynozyd	0,014	0,001
Kwas cytrynowy	-	$y = 2,465,685x - 67,321$	0,9993	Kwas cytrynowy	5,64	0,48
Kwas chlorogenowy	-	$y = 47,887,804x + 240,274$	0,9960	Kwas chlorogenowy	6,35	0,23
				Kwas neochlorogenowy	4,85	0,31
Kwas protokatechowy	-	$y = 31,018,319x + 1,007,975$	0,9987	Kwas protokatechowy	0,53	0,02
Kwas p-kumarowy	-	$y = 25,723,840x - 872,820$	0,9977	Kwas p-kumarowy	0,24	0,007
				p-kumaryloglukozyd	7,96	0,51
Kwas gentyzynowy	-	$y = 16,868,073x - 941,479$	0,9996	Kwas gentyzynowy	1,053	0,048
Kwas rozmarynowy	-	$y = 336,094,991x + 420,952$	0,9993	Kwas rozmarynowy	1,1	0,08

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja polifenolowa z naturalnych składników zawierająca owoce brzoskwini, aronii, borówki, poziomki, maliny **znamienna tym**, że zawiera liście pietruszki (*Petroselinum crispum* L), zaś składniki naturalne i owoców brzoskwini (*Prunus persica* L.), owoców aronii (*Aronia melanocarpa* L), owoców borówki czarnej (*Vaccinium myrtillus* L.), owoców poziomki (*Fragaria vesca* L.), owoców malin (*Rubus idaeus* L) oraz liści pietruszki (*Petroselinum crispum* L) występują w postaci wodnych ekstraktów w postaci zatężonej do 5%–10% początkowej ich objętości, przy czym każdy z ekstraktów występuje w ilości od 12,0 do 20,0 części wagowych.

2. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że zawiera dodatkowo wodny ekstrakt z owoców moreli (*Prunus armeniaca*) w ilości od 12,0 do 20,0 części wagowych i/lub z owoców żurawiny (*Oxycoccus*) w ilości od 12,0 do 20,0 części wagowych.

Rysunki

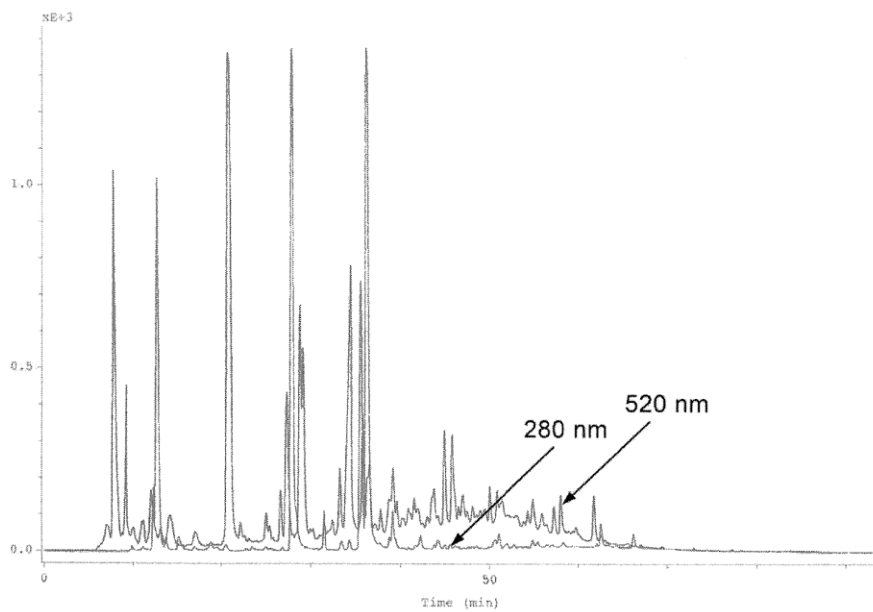


Fig.1

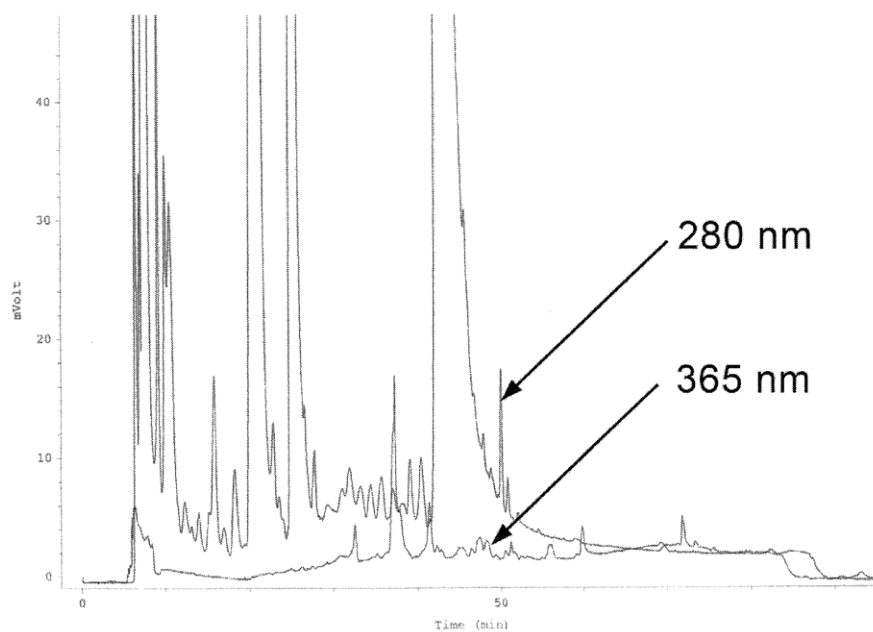


Fig.2