



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119445** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)

A61K 31/195 (2006.01)

A61K 31/197 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61K 31/185 (2006.01)

A61P 25/00

A61P 25/02 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2016 03187	(72) Винахідник(и):	Коен Даніель (FR), Чумаков Ілья (FR), Набірочкін Сергій (FR), Ґуедж Мікаель (FR), Вьяль Емануель (FR)
(22) Дата подання заявки:	01.09.2014	(73) Власник(и):	ФАРНЕКСТ, 11 Rue des Peupliers, F-92130 Issy Les Moulineaux, France (FR)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.06.2019	(74) Представник:	Слободянюк Тарас Олександрович, реєстр. №217
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	14/014,650	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2012/117073 A2, 07.09.2012 WO 2012/117075 A2, 07.09.2012
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	30.08.2013		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.04.2017, Бюл.№ 7		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.06.2019, Бюл.№ 12		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/EP2014/068494, 01.09.2014		

(54) НОВІ КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ НЕВРОЛОГІЧНИХ РОЗЛАДІВ

(57) Реферат:

Винахід стосується комбінації, що містить щонайменше торасемід і баклофен або їх солі, для регенерації нервів або нейронів у суб'єкта, що страждає від ушкодження нерва, вибраного з невротаксії, аксонотмезиса або невротмезиса, невропатії, викликаной прямим фізичним інсультом нерва або від хвороби Шарко-Марі-Тута.

UA 119445 C2

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід відноситься до композицій і способів лікування неврологічних захворювань і розладів. Більш конкретно, даний винахід відноситься до нових комбінованих терапій таких захворювань, як хвороба Альцгеймера й споріднених захворювань, розсіяного склерозу, бічного

5 аміотрофічного склерозу, хвороби Паркінсона, невротії, алкоголізм, алкогольна абстиненція, хвороба Хантінгтона та уражень спинного мозку.

Попередній рівень техніки

Хвороба Альцгеймера (AD) є прототипною кортикальною деменцією, яка характеризується дефіцитом пам'яті разом з дисфазією (розладом мовлення, при якому має місце погіршення

10 мовлення й розуміння мови), диспраксією (нездатністю до координації й здійснення певних навмисних рухів і жестів за відсутності моторної або сенсорної недостатності) і агнозії (здатності розпізнавати суб'єкти, людей, звуки, форми або запахи) зумовлених залученням областей кортикальної асоціації (1-4).

AD на даний час є найпоширенішою причиною деменції. Клінічно характеризується

15 глобальним зниженням когнітивної функції, яка повільно прогресує й залишає пацієнтів у термінальній стадії прикутими до постелі, що страждають на нетримання і є залежними від кустодіальної допомоги. Смерть настає, у середньому, через 9 років після встановлення діагнозу (5).

Коефіцієнт захворюваності AD драматично зростає з віком. За оцінками демографічних

20 прогнозів Організації Об'єднаних Націй кількість людей старше 80 років до 2050 року наблизиться до 370 мільйонів. На даний час за оцінками 50 % людей старше 85 років страждають на AD. Отже, в 50 роках більше ніж 100 мільйонів людей у всьому світі будуть страждати на деменцію. Величезна кількість людей, які потребують постійного догляду та інших послуг, впливатиме на медичні, фінансові й людські ресурси (6). Погіршення пам'яті є ранньою

25 ознакою захворювання й включає епізодичну пам'ять (пам'ять на добові-сьогоднішні події). Семантична пам'ять (пам'ять для вербального й візуального змісту) при хворобі уражається пізніше. Патологічні ознаки AD включають амілоїдні бляшки, які містять бета-амілоїд (Abeta), нейрофібрилярні клубки (NFT), які містять Тау, і нейрональну та синаптичну дисфункцію й втрату (7-9). За останнє десятиліття були запропоновані дві основні гіпотези щодо причин AD:

30 "гіпотеза амілоїдного каскаду", у якій стверджується, що нейродегенеративний процес є серією подій, спричинених аномальним процесингом білка-попередника амілоїду (APP) (10), і "гіпотезою нейрональної цитоскелетної дегенерації" (11), яка припускає, що зміни цитоскелета є ініціюючими подіями. Найбільш поширеною теорією, яка пояснює прогресування AD, залишається гіпотеза амілоїдного каскаду (12-14), а дослідники AD головним чином

35 сфокусовані на визначенні механізмів, які лежать в основі токсичності, асоційованої з білками Abeta. Мікросудинна проникність і ремоделювання, аберантний ангіогенез і гематоенцефалічний бар'єр були визначені як ключових подій, що сприяють токсичності APP в амілоїдному каскаді (15). Напроти, білку Тау з боку фармацевтичної промисловості було приділено набагато менше уваги, чому амілоїду, через фундаментальні й практичні проблеми.

40 Більше того, зміна синаптичної щільності є патологічним ураженням, яке краще корелює з когнітивними порушеннями, ніж два інших.

Дослідження виявили, що амілоїдна патологія, очевидно, прогресує нейротрансмітер-специфічним чином, при цьому холінергічні закінчення видаються найбільш уразливими, за

45 ними ідуть глутаматергічні закінчення, і, нарешті, ГАМК-ергічні закінчення (9). Глутамат є найпоширенішим нейромедіатором збудження у нервовій системі ссавців. У патологічних станах його аномальне нагромадження в синаптичній щілині призводить до гіперактивації глутаматних рецепторів (16). Аномальне нагромадження глутамату в синаптичній щілині призводить до гіперактивації глутаматних рецепторів, результатом чого є патологічні процеси й нарешті, смерть нейрона. Цей процес, який називається ексайтотоксичністю, зазвичай спостерігається в

50 тканинах нейронів у ході гострих і хронічних неврологічних розладів.

Стає очевидним, що ексайтотоксичність бере участь у патогенезі декількох захворювань різної етіології, таких як: травми спинного мозку, інсульт, черепно-мозкова травма, втрата слуху, алкоголізм і алкогольна абстиненція, алкогольна невротія або невротичний біль, а також нейродегенеративні захворювання, такі як розсіяний склероз, хвороба Альцгеймера,

55 бічний аміотрофічний склероз, хвороба Паркінсона й хвороба Хантінгтона (17-19). Розробка ефективного лікування цих захворювань залишається основною проблемою суспільної охорони здоров'я через частоту їх виникнення, а також через відсутність лікувальних процедур.

Антагоністи NMDAR, які націлені на різні ділянки даного рецептора, були протестовані для протидії ексайтотоксичності. Неконкурентні антагоністи NMDAR націлені на пору іонного каналу,

60 таким чином, знижуючи вхід кальцію в постсинаптичні нейрони. Деякі з них досягли статусу

схвалення. Наприклад, мамантин на даний час схвалений при хворобі Альцгеймера від помірної до важкої. Він клінічно протестований за інших показань, які включають компонент ексайтотоксичності, таких як алкогольна залежність (фаза II), бічний аміотрофічний склероз (фаза III), деменція, пов'язана з Паркінсонізмом (Фаза II), епілепсія, хвороба Хантінгтона (фаза IV), розсіяний склероз (фаза IV), хвороба Паркінсона (фаза IV) і черепно-мозкова травма (фаза IV). Дана молекула однак, проявляє обмежену користь для більшості пацієнтів із хворобою Альцгеймера, оскільки вона виявляє помірні симптоматичні ефекти. Інший підхід до обмеження ексайтотоксичності, полягає в інгібуванні пресинаптичного вивільнення глутамату. Рилузол, на даний час затверджений при бічному аміотрофічному склерозі, демонструє обнадійливі результати при ішемії й на моделях черепно-мозкової травми (20-23). На даний час він протестований у випробуваннях фази II для раннього розсіяного склерозу, хвороби Паркінсона (не демонструє кращих результатів, ніж плацебо), а також ураження спинного мозку. В 1995 році лікарський засіб досяг статусу орфанного препарату для лікування бічного аміотрофічного склерозу й в 1996 році для лікування хвороби Хантінгтона.

WO 2009/133128, WO 2009/133141, WO 2009/133142 і WO 2011/054759 розкривають молекули, які можуть бути використані в композиціях для лікування неврологічних розладів.

Незважаючи на активні дослідження в даній галузі, існує потреба розробки альтернативних або поліпшених ефективних терапій неврологічних розладів, і, зокрема, неврологічних розладів, які пов'язані з токсичністю глутамату й/або амілоїду бета. На даний час у винаході пропонується нові типи лікування таких неврологічних розладів центральної нервової системи (CNS) і периферійної нервової системи (PNS).

Сутність винаходу

Суб'єкт даного винаходу полягає в пропозиції нових терапевтичних підходів до лікування неврологічних розладів.

Винахід обумовлюється, зокрема, несподіваним виявленням авторами того, що торасемід, триметазидин, мексилетин, бромокріптин, іфенпроділ і моксифлоксацин, окремо або в комбінації, представляють нові й ефективні терапії для лікування неврологічних розладів.

У винаході, отже, пропонуються нові композиції й способи лікування неврологічних розладів, зокрема, AD і пов'язаних розладів, розсіяного склерозу (MS), бічного аміотрофічного склерозу (ALS), хвороби Паркінсона (PD), нейропатії (наприклад, невропатичного болю або алкогольної невропатії), алкоголізму або алкогольної абстиненції, уражень периферійної нервової системи, хвороби Хантінгтона (HD) і травми спинного мозку.

Зокрема, винахід відноситься до композиції, яка застосовується для лікування неврологічних розладів, яка включає, щонайменше, торасемід, триметазидин, мексилетин, іфенпроділ, моксифлоксацин або бромокріптин, або їх солі, проліки, похідні або композиції з уповільненим вивільненням.

Крім того даний винахід відноситься до композиції, яка включає, щонайменше, одну першу сполуку, обрану із групи, яка складається з торасеміду, триметазидину, мексилетину, іфенпроділу, моксифлоксацину й бромокріптину, або солі, проліків, похідного будь-якої хімічної чистоти або його композиції з уповільненим вивільненням у комбінації, щонайменше, з однією другою сполукою, відмінною від зазначеної першої сполуки, обраної із солей, проліків, похідних будь-якої хімічної чистоти сульфосоксазолу, метимазолу, прилокаїну, дифіліну, хінакрину, карбенексолону, акампролату, амінокапронової кислоти, баклофену, каберголіну, диетилкарбамазину, цинальцету, цинаризину, еплерону, фенолдопаму, лефлуноміду, левосимендану, сулодексиду, термінафіну, зонісаміду, етомідату, феноформіну, триметазидину, мексилетину, бромокріптину, іфенпроділу, торасеміду й моксифлоксацину, або їх композицій з уповільненим вивільненням для одночасного, окремого або послідовного введення.

Іншим суб'єктом даного винаходу є композиція для застосування при лікуванні неврологічного розладу, що включає, щонайменше, одну першу сполуку, обрану із групи, яка складається з торасеміду, триметазидину, мексилетину, іфенпроділу, моксифлоксацину, бромокріптину, або їх солей, проліків, похідних будь-якої хімічної чистоти, або композиції для уповільненого вивільнення, у комбінації, щонайменше, з однією другою сполукою, відмінною від зазначеної першої сполуки, обраної з між сульфосоксазолу, метимазолу, прилокаїну, дифіліну, хінакрину, карбенексолону, акампролату, амінокапронової кислоти, баклофену, каберголіну, диетилкарбамазину, цинальцету, цинаризину, еплерону, фенолдопаму, лефлуноміду, левосимендану, сулодексиду, термінафіну, зонісаміду, етомідату, феноформіну, триметазидину, мексилетину, бромокріптину, іфенпроділу, торасеміду, і моксифлоксацину, їхніх солей, проліків, похідних будь-якої хімічної чистоти, або композицій для уповільненого вивільнення, для одночасного, окремого або послідовного введення.

Даний винахід також відноситься до композиції, яка включає, щонайменше, одну першу сполуку, обрану із групи, яка складається з торасеміду, триметазидину, мексилетину, іфенпроділу, моксифлоксацину й бромокріптину, або їх солі, проліків, похідного будь-якої хімічної чистоти або композиції з уповільненим вивільненням у комбінації, щонайменше, з однією другою сполукою, відмінною від зазначеної першої сполуки, обраної із сульфісоксазолу, метимазолу, прилокаїну, дифіліну, хінакрину, карбеноксолону, акампросату, амінокапронової кислоти, баклофену, каберголіну, диетилкарбамазину, цинальцету, цинаризину, еплерону, фенолдопаму, лефлуноміду, левосимендану, сулодексиду, термінафіну, зонісаміду, етомідату, феноформіну, триметазидину, мексилетину, бромокріптину, іфенродилу, торасеміду й моксифлоксацину, або їх композицій з уповільненим вивільненням або їх солей, проліків, похідних будь-якої хімічної чистоти для одночасного, окремого або послідовного введення.

Найкращі композиції лікарських засобів включають 1, 2, 3, 4 або 5 різних лікарських засобів, ще краще 2, 3 або 4. Більше того, вищевказані композиції лікарських засобів також можуть бути використані в додатковій композиції з одним або декількома додатковими лікарськими засобами або обробками, що мають сприятливий вплив на суб'єктів з неврологічним розладом.

Винахід також відноситься до способу лікування неврологічного розладу, який передбачає введення суб'єктові, який цього потребує, лікарського засобу або композиції, зазначеної вище.

Інший суб'єкт винаходу відноситься до способу лікування неврологічного розладу, який передбачає одночасно, окремо або послідовне введення суб'єктові, який цього потребує, комбінації лікарських речовин, описаних вище.

Ще один об'єкт винаходу відноситься до застосування, щонайменше, однієї сполуки, обраної із групи, яка складається з торасеміду, триметазидину, мексилетину, іфенпроділу, бромокріптину й моксифлоксацину, або їх солі(ей), проліків, похідного(их) будь-якої хімічної чистоти, або композиції(ій) для уповільненого вивільнення, для виготовлення лікарського засобу для лікування неврологічного розладу.

Інший суб'єкт винаходу відноситься до застосування комбінацій лікарських засобів, описаних вище, для виготовлення лікарського засобу для лікування неврологічного розладу.

Винахід може бути використаний для будь-якого суб'єкта - ссавця, особливо для суб'єкта-людини, на будь-якій стадії захворювання.

Короткий опис креслень

Для Фігур 1-27, *: $p < 0,05$: значимо відрізняється від контролю (без інтоксикації); "ns": незначимий ефект (ANOVA + апостеріорний критерій Даннета)

Фігура 1: Вплив попередньої обробки обраними лікарськими засобами на ураження НВМЕС людським $A\beta_{1-42}$. А) Перевірка експериментальної моделі, яка використовується для скринінгу лікарських засобів: 1 год. попередня обробка VEGF при 10 нМ значимо захищає капілярну мережу від даного амілоїдного ураження (+70 % капілярної мережі в порівнянні з амілоїдною інтоксикацією). Торасемід (В) і бромокріптин (С) у дозах до 400 нМ і 3,2 нМ значимо запобігають інтоксикації, відповідно, тоді як відсутність ефекту або слабкий ефект відзначається для верхньої й нижньої доз. \diamond : $p < 0,05$: значимо відрізняється від амілоїдної інтоксикації.

Фігура 2: Вплив попередньої обробки обраними лікарськими засобами на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на шурячих первинних кортикальних клітинах. А) Перевірка експериментальної моделі, використовуваної для скринінгу лікарських засобів: 1 год. попередня обробка естрадіолом (150 нг/мл) значимо захищала нейрони від амілоїдного ураження (-70 %), яка розглядається як позитивний контроль для нейропротекції. Для всіх експериментів $A\beta_{1-42}$ продукує значиму інтоксикацію в порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Інтоксикація значимо пригнічується бромкріптином (40 нМ, -29 %) (В), триметазидином (40 нМ, -94 %) (С), іфенпроділом (600 нМ, -94 %) (D), мексилетином (3,2 нМ, -73 %) (Е), моксифлоксацином (20 нМ, -63 %) (F). Варто відзначити, що за інших концентрацій лікарських засобів, вплив відсутній або відзначається більш слабкий вплив для верхньої або нижньої доз. \diamond : $p < 0,05$: значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

Фігура 3: Вплив комбінації баклофену й торасеміду на загальну довжину капілярної мережі в культурах НВМЕС, інтоксикованих бета-амілоїдом. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ М) дає значиму інтоксикацію, вище 40 %, у порівнянні із клітинами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією баклофену й торасеміду (А), тоді як у цих концентраціях баклофен (В) і торасемід (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

Фігура 4: Вплив комбінованої терапії сульфісоксазолом і торасемідом на загальну довжину капілярної мережі в культурах НВМЕС, інтоксикованих бета-амілоїдом. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ М) дає значиму інтоксикацію, вище 40 %, у порівнянні із клітинами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією

сульфісоксазолу й торасеміду (А), тоді як у цих концентраціях сульфисоксазол (В) і торасемід (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

Фігура 5: Вплив комбінованої терапії еплереноном і торасемідом на загальну довжину капілярної мережі в культурах НВМЕС, інтоксикованих бета-амілоїдом. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ M) дає значиму інтоксикацію, вище 40 %, у порівнянні із клітинами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією еплеренону й торасеміду (А), тоді як у цих концентраціях торасемід (В) і еплеренон (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

Фігура 6: Вплив комбінованої терапії бромокріптіном і сульфисоксазолом на загальну довжину капілярної мережі в культурах НВМЕС, інтоксикованих бета-амілоїдом. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ M) дає значиму інтоксикацію, вище 40 %, у порівнянні із клітинами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією бромокріптину й сульфисоксазолу (А), тоді як у цих концентраціях бромокріптин (В) і сульфисоксазол (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

Фігура 7: Вплив комбінованої терапії акампросатом і іфенпроділом на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на шурячих первинних кортикальних клітинах. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) дає значиму інтоксикацію, у порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією акампросату й іфенпроділу (А), тоді як у цих концентраціях акампросат (В) і іфенпроділ (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

Фігура 8: Вплив комбінованої терапії баклофеном і мексилетином на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на шурячих первинних кортикальних клітинах. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) дає значиму інтоксикацію, у порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією баклофену й мексилетину (А), тоді як у цих концентраціях баклофен (В) і мекселітин (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p = 0,051$, відмінно від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

Фігура 9: Вплив комбінованої терапії баклофеном і триметазідином на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на шурячих первинних кортикальних клітинах. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) дає значиму інтоксикацію, у порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією баклофену й триметазидину (А), тоді як у цих концентраціях баклофен (В) і триметазидин (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

Фігура 10: Вплив комбінованої терапії цинакальцетом і мексилетином на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на шурячих первинних кортикальних клітинах. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) дає значиму інтоксикацію, у порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією цинакальцету й мексилетину (А), тоді як у цих концентраціях цинакальцет (В) і мекселітин (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

Фігура 11: Вплив комбінованої терапії цинаризином і триметазідином на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на шурячих первинних кортикальних клітинах. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) дає значиму інтоксикацію, у порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією цинаризину й триметазидину (А), тоді як у цих концентраціях цинаризин (В) і триметазидин (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

Фігура 12: Вплив комбінованої терапії триметазідином і зонісамідом на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на шурячих первинних кортикальних клітинах. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) дає значиму інтоксикацію, у порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією триметазидину й зонісаміду (А), тоді як у цих концентраціях триметазидин (В) і зонісамід (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

Фігура 13: Вплив комбінованої терапії термінафіном і торасемідом на загальну довжину капілярної мережі в культурах НВМЕС, інтоксикованих бета-амілоїдом. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ M) дає значиму інтоксикацію, вище 40%, у порівнянні із

клітинами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією тербінафіну й торасеміду (А), тоді як у цих концентраціях тербінафін (В) і торасемід (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

5 Фігура 14: Вплив комбінованої терапії цинакальцетом і мексилетином на загальну довжину капілярної мережі в культурах НВМЕС, інтоксикованих бета-амілоїдом. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ M) дає значиму інтоксикацію, вище 40%, у порівнянні із клітинами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією цинакальцету й мексилетину (А), тоді як у цих концентраціях цинакальцет (В) і мексилетин (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

10 Фігура 15: Вплив комбінованої терапії баклофеном і торасемідом на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на шурячих первинних кортикальних клітинах. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) дає значиму інтоксикацію, у порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією баклофену й торасеміду (А), тоді як у цих концентраціях баклофен (В) і торасемід (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,0572$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

15 Фігура 16: Вплив комбінованої терапії акампросатом і іфенпроділом на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на шурячих первинних кортикальних клітинах. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) дає значиму інтоксикацію, у порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією сульфісоксазолу й торасеміду (А), тоді як у цих концентраціях торасемід (В) і сульфісоксазол (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

20 Фігура 17: Вплив комбінованої терапії моксифлоксацином і триметазидином на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на шурячих первинних кортикальних клітинах. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) дає значиму інтоксикацію, у порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією моксифлоксацину й триметазидину (А). Додавання моксифлоксацину дозволяє підвищити на 100 % ефект, який спостерігається для триметазидану (С) окремо, тоді як, у такій же концентрації, моксифлоксацин (В) окремо не виявляє значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

25 Фігура 18: Вплив комбінованої терапії моксифлоксацином і баклофеном на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на шурячих первинних кортикальних клітинах. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) дає значиму інтоксикацію, у порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією моксифлоксацину й баклофену (А), тоді як у цих концентраціях моксифлоксацин (В) і баклофен (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

30 Фігура 19: Вплив комбінованої терапії моксифлоксацином і цинакальцетом на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на шурячих первинних кортикальних клітинах. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) дає значиму інтоксикацію, у порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією моксифлоксацину й цинакальцету (А), тоді як у цих концентраціях моксифлоксацин (В) і цинакальцет (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

35 Фігура 20: Вплив комбінованої терапії моксифлоксацином і зонісамідом на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на шурячих первинних кортикальних клітинах. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) дає значиму інтоксикацію, у порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією моксифлоксацину й зонісаміду (А). Додавання моксифлоксацину дозволяє підвищити на 81% ефект, який спостерігається для зонісаміду (С) окремо, тоді як, у такій же концентрації, моксифлоксацин (В) окремо не виявляє значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

40 Фігура 21: Вплив комбінованої терапії моксифлоксацином і сульфісоксазолом на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на шурячих первинних кортикальних клітинах. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) дає значиму інтоксикацію, у порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією моксифлоксацину й сульфісоксазолу (А), тоді як у цих концентраціях моксифлоксацин (В) і сульфісоксазол (С) окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

Фігура 22: Вплив комбінованої терапії мексилетином (MEX) та іфенпроділом (IFN) на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на щурячих первинних кортикальних клітинах. Агрегований людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) дає значиму інтоксикацію, у порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією 25,6 пМ мексилетину й 24 нМ іфенпроділу, тоді як у цих концентраціях мексилетин та іфенпроділ окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,0572$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

Фігура 23: Вплив комбінації баклофену (BCL) і торасеміду (TOR) на загальну довжину мережі нейритів у кортикальних нейронах, інтоксикованих бета-амілоїдом. Людський амілоїдний пептид ($A\beta_{1-42}$ 2,5 мкМ) продукує значиму інтоксикацію, вище 15%, у порівнянні із клітинами, обробленими носієм. Дана інтоксикація значимо пригнічується комбінацією баклофену й торасеміду (A); більше того, дана комбінація дозволяє посилювати ріст нейритів. \diamond : $p < 0,05$, значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

Фігура 24: Вплив комбінованої терапії цинакальцетом і мексилетином проти токсичності глутамату на нейрональних кортикальних клітинах. Інтоксикація глутаматом значимо пригнічується комбінацією цинакальцету (64 пМ) і мексилетину (25,6 пМ), тоді як у цих концентраціях, цинакальцет і мексилетин окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,001$, значимо відрізняється від інтоксикації глутаматом; (ANOVA + постапостеріорний критерій Данета).

Фігура 25: Вплив комбінованої терапії сульфосоксазолу і торасемідом проти токсичності глутамату на нейрональних кортикальних клітинах. Інтоксикація глутаматом значимо пригнічується комбінацією сульфосоксазолу (64 пМ) і торасеміду (25,6 пМ), тоді як у цих концентраціях, сульфосоксазол і торасемід окремо не виявляють значимого впливу на інтоксикацію. \diamond : $p < 0,001$, значимо відрізняється від інтоксикації глутаматом; (ANOVA + постапостеріорний критерій Данета).

Фігура 26: Вплив попередньої обробки торасемідом (TOR) на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на щурячих первинних кортикальних клітинах. $A\beta_{1-42}$ приводить до значимої інтоксикації в порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Інтоксикація значимо пригнічується торасемідом (200 нМ, -90%). \diamond : $p < 0,0001$: значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

Фігура 27: Вплив попередньої обробки акампросатом і його похідним гомотаурином на вивільнення LDH у тестах токсичності $A\beta_{1-42}$ на щурячих первинних кортикальних клітинах. $A\beta_{1-42}$ приводить до значимої інтоксикації в порівнянні з нейронами, обробленими носієм. Інтоксикація однаково значимо пригнічується гомотаурином і акампросатом (99%, 8 нМ). \diamond : $p < 0,0001$: значимо відрізняється від інтоксикації $A\beta_{1-42}$.

Фігура 28: Вплив комбінації баклофену (BCL) і торасеміду (TOR) на загальну довжину мережі нейритів кортикальних нейронів, культивованих за відсутності токсичної речовини. Збільшення довжини мережі нейритів спостерігається, коли комбінація баклофену (400 нМ) і торасеміду (80 нМ) додається в культуральне середовище; більше того, дана комбінація дозволяє підсилити ріст нейритів, тоді як у цих концентраціях, баклофен і торасемід окремо не мають значимого ефекта (ns) на довжину мережі нейритів. * $p < 0,005$, значимо відрізняється від контролю.

Фігура 29: Вплив комбінації баклофену (BCL) і торасеміду (TOR) на стимуляцію регенерації нервів після роздавлювання нерва. А-А-тварини, піддані травмуванню нерва (роздавлювання нерва), оброблені комбінацією баклофену-торасеміду, демонструють значимо більш низьку затримку СМАР при стимуляції ураженого сідничного нерва на 7 день і на 30 день із моменту роздавлювання нерва в порівнянні з псевдооперованими тваринами (білий стовпчик) або тваринами, обробленими носієм. В-В-амплітуди сигналу м'язових викликаних потенціалів при стимуляції сідничного нерва нижчі у тварин, які піддавались ураженню нерва в порівнянні з псевдооперованими тваринами як на 7 день, так і на 30 день після здавлювання нерва. Значиме збільшення амплітуди СМАР спостерігається на 30 день після роздавлювання нерва для тварин оброблених баклофеном (3 мг/кг) - торасемідом (400 мкг/кг) (доза 3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$, значимо відрізняється від тварин, оброблених носієм (чорний стовпчик).

Докладний опис винаходу

У даному винаході пропонуються нові композиції для лікування неврологічних розладів. Винахід описує нове застосування лікарських засобів або нових комбінацій лікарських засобів, які дозволяють ефективно корегувати такі захворювання й можуть бути використані для лікування пацієнтів.

Винахід забезпечує лікування будь-якого неврологічного розладу, чи то центральної чи периферійної системи, зокрема розладів, при яких задіяна ексайтотоксичність амілоїду й

глутамату. Окремі приклади таких розладів включають нейродегенеративні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера й споріднені захворювання, розсіяний склероз (MS), бічний аміотрофічний склероз (ALS), хвороба Паркінсона (PD), хвороба Хантингтона (HD) або інші неврологічні розлади, такі як невропатії (наприклад, алкогольна невропатія або невропатичний біль), алкоголізм або алкогольна абстиненція й ураження спинного мозку. "Невропатії" відносяться до станів, в яких ушкодженими є нерви периферійної нервової системи, включаючи ушкодження периферійної нервової системи, спричинені генетичними факторами, запальним захворюванням, ушкодження хімічною речовиною, включаючи лікарські засоби (вінкрістин, оксаліплатин, етиловий спирт) або прямий фізичний інсульт нерва. Лікування невропатій також передбачає лікування невропатичного болю.

Ураження периферійної нервової системи можна класифікувати згідно зі стадією нейронального інсульту. Винахід придатний для лікування нервових уражень у діапазоні від нейропраксії (стан, при якому уражається лише сигнальна здатність нерва), до аксонотмезиса (ураження, яке торкається аксонів, без ушкодження оточуючих сполучних тканин нервів), а також невротмезиса (ураження, при якому страждає як аксон, так і оточуючі тканини).

Зміни в аксоні або оточуючих тканинах (таких як мієлін) можуть мати генетичне походження. Прикладом спадкових невропатій є так звана родина захворювань Шарко-Марі-Тута. Захворювання Шарко-Марі-Тута є прогресивними розладами, які впливають на периферійні нерви, які відрізняються зміною специфічного гена(ів). Мутація(ії) призводить до ураження аксонів, які передають нервові імпульси, і/або впливають на продукування мієлінової оболонки швановими клітинами, які впливають на швидкість передачі нервового імпульсу. Вони представлені декількома типами (категоризованими за функцією клінічних ознак) і підтипами CMT (відповідно до генетичної класифікації). Типами CMT є CMT1, CMT2, CMT3, CMT4, CMT5, CMT6, CMTDI, CMTRI, CMTX. Зв'язаними периферійними невропатіями є, наприклад, HNPP (спадкова невропатія зі схильністю до паралічу від здавлювання нерва), важкі демієлінізуючі невропатії (DSS, синдром Дежерин-Соттас), CHN (уроджена гіпомієлінізуюча невропатія). На CMT1 (димієлізуючого типу) і CMT2 (аксонального типу) доводиться близько 70% пацієнтів CMT.

Винахід особливо придатний для лікування AD і споріднених розладів. У контексті даного винаходу термін "розлад, пов'язаний з AD" включає сенільну деменцію типу AD (SDA(SDAT), деменцію тілець Леві, судинну деменцію, легке когнітивне порушення (MCI) і вікове погіршення пам'яті (AAMI).

Термін "лікування", як він використовується в даному документі, включає терапію, запобігання, профілактику, уповільнення або зменшення симптомів, спровокованих або спричинених вищевказаними захворюваннями або розладами. Термін лікування включає конкретний контроль прогресування захворювання й асоційованих розладів. Термін обробка зокрема включає i) захист від токсичності, спричиненої амілоїдом бета, або зниження або уповільнення зазначеної токсичності, i/або ii) захист від глутаматної ексайтотоксичності, або зниження або уповільнення зазначеної токсичності у суб'єктів, які піддаються лікуванню. Термін лікування також позначає поліпшення когнітивного симптому або захист нейрональних клітин. У відношенні невропатій, термін лікування також включає регенерацію нервів, яка включає ремієлінізацію, утворення нових нейронів, глії, аксонів, мієліну або синапсів.

У контексті винаходу, позначення специфічних сполук повинне включати не тільки специфічно позначені молекули, але також будь-яку фармацевтично прийнятну сіль, гідрати, похідні (наприклад, складний ефір, простий ефір), ізомери, рацемати, кон'югати або їх проліки будь-якого ступеню чистоти.

Термін "проліки", як він використовується в даному документі, позначає будь-яке функціональне похідне (або попередник) сполуки запропонованої даним винаходом, який при введенні в біологічну систему, генерує зазначену сполуку в результаті, наприклад, спонтанної хімічної(их) реакції(й), хімічної(их) реакції(й), каталізованої ферментом, i/або метаболічної(их) хімічної(их) реакції(й). Проліки, як правило, є неактивними або менш активними, ніж отриманий у результаті лікарський засіб, і можуть використовуватися, наприклад, для поліпшення фізико-хімічних властивостей лікарського засобу, для спрямовування лікарського засобу в конкретну тканину, для поліпшення фармакокінетичних і фармакодинамічних властивостей лікарського засобу й/або для зменшення небажаних побічних ефектів. Проліки, як правило, мають структуру X-лікарського засобу, де X є компонентом інертного носія, і лікарський засіб є активною сполукою, при цьому проліки є менш активним, ніж лікарський засіб, і лікарський засіб вивільняється з носія in vivo. Деякі з поширених функціональних груп, які часто включають при розробці проліків, включають, зокрема, карбоксильну, гідроксильну, аміногрупу, фосфат/фосфонат і карбонільну групу. Проліки, які, як правило, одержують за допомогою

модифікації цих груп, включають, зокрема, ефіри, карбонати, карбамати, амідни й фосфати. Конкретні технічні рекомендації для вибору придатних проліків відомі з області загальних знань (24-28). Крім того, приготування проліків може бути здійснене за допомогою звичайних способів, відомих фахівцям у даній галузі. Способи, які можуть використовуватися для синтезу проліків, описані в численних оглядах з даної теми (25; 29-35). Наприклад, арбаклофен плакарбіл наведений у базі даних Chemid plus Advance (website: chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/), і арбаклофен плакарбіл є добре відомими проліками баклофену (36; 43).

Термін "похідне" сполуки включає будь-яку молекулу, яка функціонально або структурно пов'язана із зазначеною сполукою, такою як кислота, амід, складний ефір, простий ефір, ацетильований варіант, гідроксильований варіант або алкільований (C1-C6) варіант такої сполуки. Термін похідне також включає структурно пов'язану сполуку із втратою одного або декількох замісників, наведених вище. Наприклад, гомотаурин є деацетильованим похідним акампролату. Кращими похідними сполуками є молекули, які мають істотний ступінь подібності із зазначеною сполукою, який визначений за допомогою відомих методів. Подібні сполуки поряд з їхнім індексом подібності з батьківською молекулою можуть бути виявлені в численних базах даних, таких як Pubchem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>) або Drugbank (<http://www.drugbank.ca/>). У кращому втіленні, похідні повинні мати індекс подібності Танімото вище, ніж 0,4, бажано, вище, ніж 0,6, ще краще, вище, ніж 0,7, до батьківського лікарського засобу. Індекс подібності Танімото широко використовується для вимірювання структурної подібності між двома молекулами. Індекс подібності Танімото може бути розрахований за допомогою програмного забезпечення, такого як Small Molecule Subgraph Detector (37-38), доступного онлайн (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/SMSD/>). Бажано похідні повинні бути споріднені одночасно структурно й функціонально, з батьківськими сполуками, тобто, вони також повинні зберігати, щонайменше, частину активності батьківського лікарського засобу, краще вони повинні проявляти захисну активність проти токсичності Аβ і глутамату.

Термін похідні також включає метаболіти лікарського засобу, наприклад, молекулу, яка отримана в результаті (біохімічної) модифікації(й) або процесинга зазначеного лікарського засобу після введення в організм, як правило, за допомогою спеціалізованих ферментативних систем, і які демонструють або зберігають біологічну активність лікарського засобу. Метаболіти були описані як такі, що відповідають за більшу частину терапевтичної дії батьківського лікарського засобу. У конкретному втіленні термін "метаболіт", як він використовується в даному документі позначає модифікований або оброблений лікарський засіб, який зберігає, щонайменше, частину активності батьківського лікарського засобу, бажано, який має захисну активність проти токсичності Аβ або глутамату. Приклади метаболітів включають гідроксильовані форми торасеміду, що є результатом метаболізму лікарського засобу в печінці (Drug bank database (39)).

Термін "сіль" відноситься до фармацевтично прийнятної й відносно нетоксичної неорганічної або органічної солі приєднання кислоти сполуки запропонованої даним винаходом. До складу фармацевтичної солі входить пара кислоти, основної або цвитітеріонної молекули лікарського засобу із протиіоном для створення солі лікарського засобу. Широкий спектр хімічних зразків може використовуватися в реакції нейтралізації. Фармацевтично прийнятні солі відповідно до винаходу, таким чином, включають отримані за допомогою реакції головної сполуки, яка виступає у ролі основи, з неорганічною або органічною кислотою з утворенням солі, наприклад, солей оцтової кислоти, азотної кислоти, тартарової кислоти, хлороводневої кислоти, сірчаної кислоти, фосфорної кислоти, метансульфофосфатної, камфорної сульфосилікати, щавлевої кислоти, малеїнової кислоти, бурштинової кислоти або лимонної кислоти. Фармацевтично прийнятні солі запропоновані даним винаходом також включають такі, у яких головна сполука функціонує як кислота й реагує з придатною основою з утворенням солей, наприклад, натрію, калію, кальцію, магнію, амонію або холіну. Хоча більшість із даних активних речовин є біоеквівалентами, деякі можуть, серед іншого, мати властивості підвищеної розчинності або біодоступності. Підбір солі є на даний час стандартною операцією в процесі розробки лікарського засобу, яка розкрита Н. Stahl і С. G Wermuth у їхній інструкції (40).

Термін "комбінація" або "комбіноване лікування/терапія" означає лікування, при якому для досягнення біологічного ефекту суб'єктові одночасно вводяться, щонайменше, два або більше лікарських засобів. В об'єднаній терапії відповідно до даного винаходу, щонайменше, два лікарські засоби можуть вводитися разом або окремо, одночасно або послідовно. Також, щонайменше, два лікарські засоби можуть бути введені різними шляхами й за допомогою різних протоколів. Таким чином, хоча лікарські засоби комбінації можуть бути об'єднані разом, також вони можуть бути використані окремо.

Як описано в прикладах, торасемід, триметазидин, мексилетин, іфенпроділ, бромокріптин і

моксифлоксацин несподівано сильно впливають на біологічні процеси, задіяні при неврологічних розладах. Більше того, ці сполуки продемонстрували *in vivo* дуже ефективну здатність до корекції симптомів таких сполук. Ці молекули, окремо або в комбінованих терапіях, отже, представляють нові підходи до лікування неврологічних розладів, таких як хвороба Альцгеймера, розсіяний склероз, бічний аміотрофічний склероз, хвороба Паркінсона, хвороба Хантингтона, невропатій (наприклад, невропатичного болю або алкогольної невропатії), алкоголізму або алкогольної абстиненції або ураження спинного мозку. Комбінації цих лікарських засобів з іншими обраними сполуками (див. таблицю 2) особливо вигідні тим, що вони дають дивний і несподіваний синергійний ефект у дозах, у яких лікарські засоби окремо власне не впливають. Також, внаслідок їх ефективності, у даному документі описані комбінації лікарських засобів, які можуть бути використані за більш низьких доз, що також додатково є дуже істотною перевагою.

У зв'язку із цим, у конкретному втіленні винахід відноситься до композиції для застосування при лікуванні AD, розладів, пов'язаних з AD, MS, PD, ALS, HD, невропатій (наприклад, невропатичного болю або алкогольної невропатії), алкоголізму або алкогольної абстиненції, або ураження спинного мозку, що включає, щонайменше, торасемід, триметазидин, мескитин, іфенпроділ, бромокріптин або моксифлоксацин, або їх солі, проліки, похідні або композиції для уповільненого вивільнення.

Конкретні номери CAS для кожної із цих сполук, пропонуються в Таблиці 1 нижче. У Таблиці 1 наведені також, зокрема, стандартні солі, рацемати, проліки, метаболіти або похідні цих сполук, які використовуються у композиціях запропонованих винаходом.

Таблиця 1

Лікарський засіб	Номера CAS	Клас або індекс подібності Танімото
Мексилетин і споріднені сполуки		
Мексилетин	31828-71-4; 5370-01-4	
6-гідроксиметилмексилетин	53566-98-6	Метаболіт
4-гідроксимексилетин	53566-99-7	Метаболіт
3-гідроксимексилетин (МНМ)	129417-37-4	Метаболіт
N-гідроксимексилетин глюкуронід	151636-18-9	Метаболіт
Сульфісоксазол і споріднені сполуки		
Сульфісоксазол	127-69-5; 4299-60-9	
N(4)-Ацетилсульфісоксазол	4206-74-0	Метаболіт
Сульфісоксазол ацетил	80-74-0	Проліки
Сульфаметоксазол	723-46-6	0,52
Цинакальцет і споріднені сполуки		
Цинакальцет	226256-56-0; 364782-34-3	
Гідрокорична кислота	501-52-0	Метаболіт
Торасемід і споріднені сполуки		
Торасемід	56211-40-6; 72810-59-4	
Гідрокситорасемід	99300-68-2; 99300-67-1	Метаболіти
Карбокситаросемід		Метаболіт
Толбутамід	64-77-7	0,55
Бромокріптин і споріднені сполуки		
Бромокріптин	25614-03-3; 22260-51-1	
Іфенпроділ і споріднені сполуки		
Іфенпроділ	23210-56-2; 23210-58-4	

Зазначені молекули можуть бути використані окремо або, бажано, у комбінованій терапії для забезпечення найбільш ефективної клінічної користі. У зв'язку із цим, у кращому втіленні винахід відноситься до композиції для застосування при лікуванні неврологічного розладу, бажано AD, спорідненого з AD розладу, MS, PD, ALS, HD, невропатій (наприклад, невропатичного болю або алкогольної невропатії), алкоголізму або алкогольної абстиненції, або ураження спинного мозку, що включає будь-яку одну з вищевказаних сполук у комбінації, щонайменше, з однією іншою сполукою, обраною з поміж сульфісоксазолу, метимазолу,

- прилокаїну, дифіліну, хінакрину, карбеносолону, акампросату, амінокапронової кислоти, баклофену, каберголіну, диетилкарбамазину, цинакальцету, цинаризину, еплеренону, фенолдопаму, лефлуноміду, левосимендану, сулодексиду, тербінафіну, зонісаміду, етомідату, фенформіну, триметазидину, мексилетину, іфенпроділу, моксифлоксацину, бромокріптину або торасеміду або їх солей, проліків, похідних або форм з уповільненим вивільненням.

Конкретні номери CAS для кожної із цих додаткових різних сполук, відмінних від сполук таблиці 1, представлені в Таблиці 2 нижче:

Таблиця 2

Назва лікарського засобу	Номер CAS
Акампросат	77337-76-9; 77337-73-6; 107-35-7; 3687-18-1
Амінокапронова кислота	60-32-2
Баклофен	1134-47-0; 66514-99-6; 69308-37-8; 70206-22-3; 63701-56-4; 63701-55-3; 847353-30-4
Каберголін	81409-90-7
Карбеносолон	5697-56-3 або 7421-40-1
Цинаризин	298-57-7
Диетил карбамазин	90-89-1 або 1642-54-2
Дифілін	479-18-5
Еплеренон	107724-20-9
Етомідат	33125-97-2
Фенолдопам	67227-57-0 або 67227-56-9
Лефлуномід	75706-12-6
Левосимендан	141505-33-1
Метимазол	60-56-0
Моксифлоксацин	151096-09-2 або 186826-86-8 або 192927-63-2 або 354812-41-2
Фенформін	114-86-3 або 834-28-6
Прилокаїн	721-50-6 або 14289-31-7 або 14289-32-8
Квінакрин	83-89-6 або 69-05-6 або 6151-30-0
Сулодексид	57821-29-1
Тербінафін	91161-71-6
Триметазидин	5011-34-7 або 13171-25-0
Зонісамід	68291-97-4

- Конкретні приклади проліків баклофену представлені в Hanafi et al., 2011 (41), де продемонстровані ефіри баклофену й ефір карбамінової кислоти й баклофену як особливо цікаві засоби спрямованого впливу на ЦНС. Отже, такі проліки є особливо придатними для композицій запропонованих винаходом. Арбаклофен плакарбіл, згаданий раніше, також є добре відомими проліками і, таким чином, може використовуватися замість баклофену в запропонованих винаходом композиціях. Інші проліки баклофену можуть бути виявлені в наступних патентних заявках: WO 2010102071, US 2009197958, WO 2009096985, WO 2009061934, WO 2008086492, US 2009216037, WO 2005066122, US 2011021571, WO 2003077902, WO 2010120370.

- Застосовувані проліки акампросату, такі як складний ефір пантоєвої кислоти й неопентилсульфонілові ефіри, неопентилсульфоніл ефірні проліки або захищені карбоксилатом неопентил сульфоніл ефірні проліки акампросату наведені, зокрема, в WO 2009033069, WO 2009033061, WO 2009033054 WO 2009052191, WO 2009033079, US 2009/0099253, US 2009/0069419, US 2009/0082464, US 2009/0082440, і US 2009/0076147.

У кращому втіленні, винахід відноситься до композиції, яка включає:

- щонайменше, одну першу сполуку, обрану з поміж торасеміду, триметазидину, мексилетину, іфенпроділу, бромокріптину й моксифлоксацину, солі(ей), проліків, похідного(их) будь-якої хімічної чистоти, або композиції(ій) уповільненого вивільнення, у комбінації з
- щонайменше, однією другою сполукою, відмінною від зазначеної першої сполуки, обраної з поміж сульфосоксазолу, метимазолу, прилокаїну, дифіліну, хінакрину, карбеносолону, акампросату, амінокапронової кислоти, баклофену, каберголіну, диетилкарбамазину, цинакальцету, цинаризину, еплерону, фенолдопаму, лефлуноміду, левосимендану, сулодексиду, тербінафіну, зонісаміду, етомідату, фенформіну, триметазидину, мексилетину,

бромокріптину, іфенпроділу, торесаміду й моксифлоксацину, їх солі(ей), проліків, похідного(их), будь-якої хімічної чистоти, або композиції(ій) з уповільненим вивільненням, для застосування при лікуванні неврологічного розладу у суб'єкта, який цього потребує.

У конкретному втіленні, винахід відноситься до застосування цих лікарських засобів або композицій для лікування AD і пов'язаних розладів у суб'єкта, який цього потребує.

У конкретному застосуванні, винахід відноситься до застосування цих лікарських засобів або композицій для лікування >MS, PD, ALS, HD, невропатій (наприклад, невропатичного болю або алкогольної невропатії), алкоголізму або алкогольної абстиненції, або ураження спинного мозку у суб'єкта, який цього потребує.

Як описано в прикладах, комбіновані терапії з використанням одного або декількох перерахованих вище лікарських засобів, приводять до ефективної корекції хвороби Альцгеймера й інших неврологічних захворювань. Як проілюстровано в експериментальному розділі, композиції, які включають, щонайменше, торасемід, триметазидин, мексилетин, іфенпроділ, бромокріптин і моксифлоксацин, забезпечують істотний терапевтичний і біологічний ефект для запобігання токсичним ефектам амілоїдного (A β) білка або пептиду на людські клітини. Більше того, *in vivo*, ці композиції призводять до поліпшення когнітивних симптомів, а також до інгібування молекулярних шляхів, переключених A β -інтоксикацією, у межах ексайтотоксичності глутамату. Отже, вони представляють нові й потужні способи лікування такого захворювання.

Експериментальний розділ додатково демонструє, що вищезгадані композиції також є ефективними i) при синергічному захисті *in vitro* нейрональних клітин від токсичності глутамату, і ii) на додачу до клінічної користі в *in vivo* моделях для захворювань, пов'язаних з ексайтотоксичністю глутамату.

Бажано, композиції лікарських засобів запропонованих винаходом можуть включати 1, 2, 3, 4 або 5 різних лікарських засобів, ще краще 2, 3 або 4 різних лікарських засобів для комбінованого лікування хвороби Альцгеймера, пов'язаних з AD розладів, MS, PD, ALS, HD, невропатій (наприклад, невропатичного болю або алкогольної невропатії), алкоголізму або алкогольної абстиненції, або ураження спинного мозку в суб'єкта, який цього потребує. У кращому втіленні лікарські засоби запропоновані винаходом використовуються в комбінації(ях) для об'єднаного роздільного або послідовного введення, з метою забезпечення найбільш ефективного впливу.

У конкретному втіленні композиція включає (i) торасемід і (ii) сполуки, обрані з поміж бромокріптину, баклофену, сульфісоксазолу, еплерону або тербінафіну, або солі, проліки, похідні, або композиції для вповільненого вивільнення зазначених сполук (i) і (ii).

В іншому конкретному втіленні композиції включають (i) триметазидин і (ii) сполуки, обрані з поміж баклофену, цинаризину, зонісаміду або моксифлоксацину, або солей, проліків, похідних або композицій для вповільненого вивільнення зазначених сполук (i) і (ii).

Відповідно додаткового конкретного втілення, композиція включає (i) моксифлоксацин і (ii) сполуки, обрані з поміж баклофену, цинакальцету, зонісаміду, сульфісоксазолу або триметазидину, або солей, проліків, похідних, або композицій для вповільненого вивільнення зазначених сполук (i) і (ii).

В іншому додатковому конкретному втіленні, композиція включає (i) мексилетин і (ii) сполуки, обрані з баклофену, цинакальцету, іфенпроділу або левосимендану або солей, проліків, похідних або композицій вповільненого вивільнення зазначених сполук (i) і (ii).

Конкретне втілення також відноситься до композиції, яка включає (i) іфенпроділ і (ii) сполуки, обрані з поміж акампросату, левосимендану або мексилетину, або солей, проліків, похідних або композицій вповільненого вивільнення зазначених сполук (i) і (ii).

Бажано сполука запропонована винаходом для застосування при лікуванні неврологічного розладу, такого як хвороба Альцгеймера (AD), пов'язаного з AD розладу, MS, PD, ALS, HD, невропатії (наприклад, невропатичний біль або алкогольна невропатія), алкоголізм або алкогольна абстиненція, або ураження спинного мозку, включає одну з наступних комбінацій лікарського засобу, для об'єднаного, роздільного або послідовного введення:

- баклофен і торасемід;
- еплеренон і торасемід;
- акампросат та іфенпроділ;
- баклофен і мексилетин;
- баклофен і триметазидин;
- бромокріптин і сульфісоксазол;
- цинакальцет і мексилетин;
- цинаризин і триметазидин;

- сульфісоксазол і торасемід;
- триметазидин і зонісамід;
- левосимендан і мексилетин;
- левосимендан та іфенпроділ;
- 5 - левосимендан і триметазидин;
- левосимендан і моксифлоксацин;
- тербінафін і торасемід;
- моксифлоксацин і триметазидин;
- моксифлоксацин і баклофен;
- 10 - моксифлоксацин і цинакальцет;
- моксифлоксацин і зонісамід;
- моксифлоксацин і сульфісоксазол, або
- мексилетин і іфенпроділ.

15 Приклади кращих запропонованих винаходом композицій, які включають комбінацію, щонайменше, трьох сполук, для комбінованого, окремого або роздільного введення, пропонуються нижче:

- баклофен і триметазидин і торасемід;
- баклофен і цинакальцет і торасемід;
- баклофен і акампросат і торасемід;
- 20 - левосимендан і баклофен і триметазидин;
- левосимендан і амінокапроєва кислота й триметазидин;
- левосимендан і тербінафін і триметазидин, або
- левосимендан і сульфісоксазол і триметазидин.

25 Приклади кращих композицій запропонованих винаходом, які включають комбінацію, щонайменше, чотирьох сполук, для комбінованого, окремого або роздільного введення, пропонуються нижче:

- сульфісоксазол, триметазидин, торасемід і зонісамід;
- сульфісоксазол, мексилетин, торасемід і цинакальцет;
- баклофен, акампросат, торасемід і диетилкарбамазин, або
- 30 - баклофен, акампросат, торасемід та іфенпроділ.

Як описано в експериментальному розділі, вищевказані комбіновані терапії запропоновані даним винаходом індують сильний нейропротективний ефект проти токсичності Аβ і позитивно впливають на поведінкові ефективності й біохімічні тести *in vivo*. Результати демонструють, що композиції запропоновані винаходом i) ефективно коректують молекулярні шляхи, переключені, *in vivo*, агрегатами Аβ і ii) призводять до поліпшення нейрофізіологічних уражень, які спостерігаються у хворих тварин у вигляді нейронального виживання або синаптичної цілісності.

Більше того, представлені результати також демонструють, що вищевказані комбіновані терапії мають важливий синергійний нейропротективний ефект проти глутаматної ексайтотоксичності (Фігури 24 і 25, Таблиця 8), шлях якої залучений у різних неврологічних захворюваннях, таких як AD, MS, PD, ALS, HD, невропатії (наприклад, невропатичний біль або алкогольна невропатія), алкоголізм або алкогольна абстиненція, або ураження спинного мозку. Ці терапії дають позитивні результати в *in vivo* або *in vitro* моделях для цих захворювань.

Крім того, результати *in vivo* також демонструють, що композиції запропоновані даним винаходом ефективно відновлюють цілісність гематоенцефалічного бар'єра, який як відомо, вражається деякими неврологічними захворюваннями.

Суб'єктом винаходу, таким чином, також є композиції, визначені вище, для лікування неврологічного розладу, такого як хвороба Альцгеймера (AD), пов'язаного з AD розладу, MS, PD, ALS, HD, невропатії (наприклад, невропатичний біль або алкогольна невропатія), алкоголізм або алкогольна абстиненція, або ураження спинного мозку.

Інший суб'єкт винаходу полягає в застосуванні композиції, визначеної вище, для лікування неврологічного розладу, такого як хвороба Альцгеймера (AD), пов'язаного з AD розладу, MS, PD, ALS, HD, невропатії (наприклад, невропатичного болю або алкогольної невропатії), алкоголізм або алкогольна абстиненція, або ураження спинного мозку.

55 У винаході також пропонується спосіб лікування неврологічного розладу, такого як хвороба Альцгеймера (AD), пов'язані з AD розлади, MS, PD, ALS, HD, невропатії (наприклад, невропатичний біль або алкогольна невропатія), алкоголізм або алкогольна абстиненція, або ураження спинного мозку, що включає введення суб'єктові, який цього потребує, ефективної кількості композиції, описаної вище.

60 Як зазначено раніше, сполуки в комбінованому лікуванні або композиції запропоновані

даним винаходом можуть бути складені разом або окремо, і введені разом, окремо або послідовно й/або циклічно.

У зв'язку із цим, конкретне завдання винаходу полягає в способі лікування AD, пов'язаного з AD розладу, MS, PD, ALS, HD, невропатій (наприклад, невропатичного болю або алкогольної невропатії), алкоголізму або алкогольної абстиненції, або ураження спинного мозку, який передбачає введення одночасно, окремо або послідовно суб'єктові, який цього потребує, ефективною кількістю композиції, описаної вище.

У кращому втіленні винахід відноситься до способу лікування хвороби Альцгеймера (AD), пов'язаного з AD розладу, MS, PD, ALS, HD, невропатій (наприклад, невропатичного болю або алкогольної невропатії), алкоголізму або алкогольної абстиненції, або ураження спинного мозку, у суб'єкта, який цього потребує, що включає щонайменше, торасемід, триметазидин, мескитин, іфенпроділ, бромокріптин або моксифлоксацин, або їх солі(їй), проліків, похідного(их) або композиції(їй) для уповільненого вивільнення, бажано в комбінації, з описаними вище.

В іншому втіленні даний винахід відноситься до способу лікування хвороби Альцгеймера (AD), розладу, пов'язаного з AD, MS, PD, ALS, HD, невропатій (наприклад, невропатичного болю або алкогольної невропатії), алкоголізму або алкогольної абстиненції, або ураження спинного мозку, у суб'єкта, який цього потребує, який передбачає одночасне, окреме або послідовне введення суб'єктові, щонайменше, однієї першої сполуки, обраної із групи, яка включає торасемід, триметазидин, мескитин, іфенпроділ, бромкріптин і моксифлоксацин, їх солі, проліки, похідні або будь-які композиції, у комбінації, щонайменше, з однією другою сполукою, яка відрізняється від першої зазначеної сполуки, і яка обрана з поміж сульфісоксазолу, метимазолу, прилокаїну, дифіліну, хінакрину, карбенексолону, акампросату, амінокапронової кислоти, баклофену, каберголіну, диетилкарбамазину, цинакальцету, цинаризину, еплеренону, фенолдопаму, лефлуноміду, левосимендану, сулодексиду, тербінафіну, зонісаміду, етомідату, фенформіну, триметазидину, мескитину, бромокріптину, іфенпроділу, торасеміду й моксифлоксацину або їх солей, проліків, похідних або форм із пролонгованим вивільненням.

У додатковому втіленні, винахід відноситься до способу лікування хвороби Альцгеймера, пов'язаного з AD розладу, MS, PD, ALS, HD, невропатій (наприклад, невропатичного болю або алкогольної невропатії), алкоголізму або алкогольної абстиненції, або ураження спинного мозку, у суб'єкта, який цього потребує, щонайменше, однією першою сполукою, обраною із групи, яка включає торасемід, триметазидин, мескитин, іфенпроділ, бромкріптин і моксифлоксацин, їх солі, проліки, похідні або будь-які композиції, у комбінації, щонайменше, з однією другою сполукою, яка відрізняється від першої зазначеної сполуки, і яка обрана з поміж сульфісоксазолу, метимазолу, прилокаїну, дифіліну, хінакрину, карбенексолону, акампросату, амінокапронової кислоти, баклофену, каберголіну, диетилкарбамазину, цинакальцету, цинаризину, еплеренону, фенолдопаму, лефлуноміду, левосимендану, сулодексиду, тербінафіну, зонісаміду, етомідату, фенформіну, триметазидину, мескитину, бромокріптину, іфенпроділу, торасеміду й моксифлоксацину або їх солей, проліків, похідних або будь-яких композицій.

Як описано в прикладах, крім ефективності в захисті нейронів від глутаматної токсичності, терапія баклофеном-торасемідом також є особливо ефективною для стимуляції нейронального клітинного росту, навіть за відсутності будь-якого експонування токсичного агента або стану. Більше того, in vivo, дана комбінована терапія призводить до поліпшення при втраті передачі нервового сигналу після ураження нерва. Тому комбінація баклофену-торасеміду представляє нову й потужну терапію для лікування невропатій, нервових уражень, і уражень спинного мозку, визначених вище.

У зв'язку із цим у конкретному втіленні винахід відноситься до способу лікування невропатій, наприклад, уражень периферійних нервів або уражень спинного мозку, який передбачає введення суб'єктові, який цього потребує, композиції, яка включає солі, проліки, похідні або будь-які композиції баклофену й торасеміду.

В іншому конкретному втіленні винахід відноситься до способу лікування невропатій, наприклад, спадкових невропатій, таких як СМТ-захворювання, який передбачає введення суб'єкту, що цього потребує, композиції, яка включає солі, проліки, похідні або будь-які композиції баклофену й торасеміду.

У більш конкретному втіленні винахід відноситься до способу лікування СМТ1 або СМТ2 який передбачає введення суб'єкту, що цього потребує, композиції, яка включає солі, проліки, похідні або будь-які композиції баклофену й торасеміду.

Конкретним завданням винаходу також є спосіб лікування невропатій, наприклад, уражень периферійних нервів, або уражень спинного мозку, який передбачає одночасне, роздільне або

послідовне й/або повторне введення суб'єктові, який потребує такого лікування, ефективної кількості баклофену й торасеміду, як описано вище.

Незважаючи на прекрасну ефективність *in vitro* та *in vivo*, залежно від суб'єкта або специфічного стану, способи й композиції запропоновані даним винаходом можуть бути використані в додатковій комбінації з додатковими лікарськими засобами або обробками, придатними для лікування неврологічного стану в суб'єктів. У зв'язку із цим, у конкретному втіленні, лікарський засіб(а) або композиції запропоновані даним винаходом можуть бути додатково об'єднані з екстрактами *Ginkgo biloba*. Придатні екстракти включають, без обмеження, екстракти *Ginkgo biloba*, поліпшені екстракти *Ginkgo biloba* (наприклад, збагачені активними інгредієнтами або в яких зменшений зміст домішок) або будь-який лікарський засіб, що містить екстракти *Ginkgo biloba*.

Екстракти *Ginkgo biloba* можуть бути використані в композиції, яка включає, щонайменше, торасемід, триметазидин, мексилетин, бромокріптин, іфенпроділ і моксифлоксацин.

У кращих втіленнях, екстракти *Ginkgo biloba* використовуються в комбінації з кожною з наступних комбінацій лікарських засобів:

- акампросат і іфенпроділ;
- баклофен і мексилетин;
- баклофен і торасемід;
- баклофен і триметазидин;
- бромокріптин і сульфісоксазол;
- цинакальцет і мексилетин;
- цинаризин і триметазидин;
- еплеренон і торасемід;
- сульфісоксазол і торасемід;
- триметазидин і зонісамід;
- левосимендан і мексилетин;
- левосимендан і іфенпроділ;
- левосимендан і триметазидин;
- левосимендан і моксифлоксацин;
- тербінафін і торасемід;
- моксифлоксацин і баклофен;
- моксифлоксацин і цинакальцет;
- моксифлоксацин і зонісамід;
- моксифлоксацин і сульфісоксазол;
- мексилетин і іфенпроділ;
- баклофен і триметазидин і торасемід;
- баклофен і цинакальцет і торасемід;
- баклофен і акампросат і торасемід;
- сульфісоксазол і триметазидин і торасемід і зонісамід;
- сульфісоксазол і мексилетин і торасемід і цинакальцет;
- баклофен і акампросат і торасемід і диетилкарбамазин;
- баклофен і акампросат і торасемід і диетилкарбамазин і іфенпроділ;
- левосимендан і баклофен і триметазидин;
- левосимендан і амінокапроєва кислота й триметазидин;
- левосимендан і тербінафін і триметазидин, або
- левосимендан і сульфісоксазол і триметазидин.

Інші терапії, які використовуються в комбінації з лікарським засобом(ами) або комбінацією(ами) лікарських засобів відповідно до даного винаходу, можуть включати один або кілька лікарських засобів, які полегшують симптоми хвороби Альцгеймера, пов'язаного з AD розладу, MS, PD, ALS, HD, невропатій (наприклад, невропатичного болю або алкогольної невропатії), алкоголізму або алкогольної абстиненції, або ураження спинного мозку або лікарського засобу(в), та який може бути використаний для паліативного лікування цих розладів.

Наприклад, комбінації запропоновані даним винаходом можуть бути використані в комбінації з донепезилом (CAS: 120014-06-4), габапентином (CAS: 478296-72-9; 60142-96-3), галантаміном (357-70-0), рівастигміном (123441-03-2) або мемантином (CAS: 19982-08-2).

Ще одним об'єктом винаходу є застосування сполуки або комбінації сполук, описаних вище, для виготовлення лікарського засобу для лікування перерахованих вище розладів, шляхом об'єднаного, роздільного або послідовно введення їх суб'єктові, який цього потребує.

Іншим об'єктом винаходу є спосіб одержання фармацевтичної композиції, який передбачає змішування вищевказаних сполук у відповідному наповнювачі або носії.

Тривалість лікування також залежить від стадії захворювання або розладу, який піддається лікуванню, застосованої комбінації, рецидивів і стану пацієнта, і того, як пацієнт відповідає на лікування. Дозування, частота й спосіб уведення кожного компонента комбінації може контролюватися незалежно. Наприклад, один лікарський засіб може вводитися перорально, у той час як другий лікарський засіб може вводитися внутрішньом'язево. Комбінована терапія може надаватися періодичними циклами, які включають періоди відпочинку так, щоб організм пацієнта мав можливість відновитися від усе ще присутніх непередбачених побічних ефектів. Лікарські засоби також можуть бути складені разом так, щоб одним уведенням доставлялися всі лікарські засоби.

Введення кожного лікарського засобу комбінації може здійснюватися будь-яким придатним засобом, який створює концентрацію лікарського засобу, яка у поєднанні з іншим компонентом, здатна полегшити стан пацієнта або ефективність лікування захворювання або розладу.

У той час як для активних інгредієнтів можливе введення комбінації у вигляді чистої хімічної речовини, бажано представити їх у вигляді фармацевтичної композиції, яка також позначається в даному контексті як фармацевтична композиція. Можливі композиції включають ті, які є придатними для перорального, ректального, місцевого (включаючи трансдермальне, букальне й під'язичне), або парентерального (включаючи під'язичне, внутрішньом'язове, внутрішньовенне й внутрішньошкірне) уведення.

Частіше ці фармацевтичні композиції прописуються суб'єктові в "упакуваннях для пацієнта", які містять дозовані одиниці або інші засоби для введення відміряних одиничних доз для застосування в ході окремого періоду лікування в одиничному упакуванні, як правило, у блістерній упаковці. Упакування для пацієнта мають переваги над традиційними прописами, де фармацевт відокремлює забезпечення пацієнта фармацевтичним засобом із нерозфасованого продукту, у тому розумінні, що пацієнт завжди має доступ до листка-вкладки в упакуванні пацієнта, яка, як правило, відсутня в традиційних рецептах. Було показано, що наявність вкладки поліпшує дотримання інструкцій лікаря. Таким чином, винахід додатково включає фармацевтичну композицію, як раніше було описано в даному документі, у комбінації з пакувальним матеріалом, придатним для зазначених композицій. У такому упакуванні для пацієнта цільове застосування композиції для комбінованого лікування може бути виведене за допомогою інструкцій, пристосувань, приписів, адаптацій і/або інших засобів допомоги щодо використання композиції, найкращим для лікування способом. Такі заходи роблять упакування для пацієнта особливо придатним й адаптованим для застосування при лікуванні композицією запропонованою даним винаходом.

Лікарський засіб може утримуватися, у будь-якій потрібній кількості, у будь-якій придатній речовині-носії (наприклад, наповнювачі, носії, основі), які можуть становити 1-99 % за масою від загальної маси композиції. Композиція може бути представлена в дозованій формі, придатній для перорального, парентерального (наприклад, внутрішньовенного, внутрішньом'язового), ректального підшкірного, назального, вагінального, інгалаційного, шкірного (пластичного) або очного шляху введення. Таким чином, композиція може мати форму, наприклад, таблеток, капсул, пігулок, порошків, гранулятів, суспензій, емульсій, розчинів, гелів, включаючи гідрогелі, паст, мазей, кремів, пластирів, дозаторів для перорального введення, осмотичних засобів доставки, супозиторіїв, клізм, лікарських форм для ін'єкцій, імплантів, спреїв і аерозолів.

Фармацевтичні композиції можуть бути складені відповідно до стандартної фармацевтичної практики (див., наприклад, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 і Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York).

Фармацевтичні композиції запропоновані винаходом можуть бути складені для вивільнення активного лікарського засобу фактично відразу ж після введення або в будь-який заданий час або період часу після введення.

Композиції для контрольованого вивільнення включають (i) композиції, які створюють фактично постійну концентрацію лікарського засобу в організмі протягом тривалого періоду часу; (ii) композиції, які після попередньо визначеного лаг-періоду, створюють фактично постійну концентрацію лікарського засобу в організмі протягом тривалого періоду часу; (iii) композиції, які підтримують дію лікарського засобу протягом попередньо визначеного періоду часу шляхом підтримання порівняно постійного ефективного рівня лікарського засобу в організмі із супутньою мінімізацією небажаних побічних ефектів, пов'язаних із флуктуаціями в рівні плазми речовини активного лікарського засобу; (iv) композиції, які локалізують дію лікарського засобу, наприклад, просторовим розташуванням композиції з контрольованим вивільненням поблизу до або у хворій тканині або органі; і (v) композиції, які направляють дію лікарського засобу за допомогою носіїв або хімічних похідних для доставки лікарського засобу

до конкретного типу цільових клітин.

Уведення лікарських засобів у формі композиції для контрольованого вивільнення є особливо бажаним у випадках, у яких лікарський засіб має (i) вузький терапевтичний діапазон (тобто незначна відмінність між концентрацією в плазмі, яка приводить до шкідливих побічних ефектів або токсичних реакцій і концентрацією в плазмі, яка забезпечує терапевтичний ефект; загалом, терапевтичний діапазон, ТД, визначається як співвідношення дози половинної смертності (LD_{50}) до середньої ефективної дози (ED_{50})); (ii) вузьким вікном абсорбції в шлунково-кишковому тракті; або (iii) дуже коротким періодом напівжиття для того, щоб часте дозування протягом дня потрібне було для підтримання рівня в плазмі на терапевтичному рівні.

Будь-яка кількість стратегій може бути використана для одержання контрольованого вивільнення, при якому швидкість вивільнення перевершує швидкість метаболізму розглянутого лікарського засобу. Контрольоване вивільнення може бути отримана відповідним підбором різних параметрів композиції й інгредієнтів, включаючи, наприклад, різні типи композицій і покриттів для контрольованого вивільнення. Таким чином, лікарський засіб складений з відповідними наповнювачами у фармацевтичну композицію, яка, при введенні, вивільняє лікарський засіб контрольованим чином (одно- або багатоелементні таблетки або композиції капсул, олійні розчини, суспензії, емульсії, мікрокапсули, мікросфери, наночасточки, плівки й ліпосоми).

Тверді дозовані форми для перорального застосування

Композиції для перорального застосування включають таблетки, які містять активний(і) інгредієнт(и) у суміші з нетоксичними фармацевтично прийнятними наповнювачами. Ці наповнювачі можуть бути, наприклад, інертними розріджувачами або наповнювачами (наприклад, сахарозою, мікрокристалічною целюлозою, крохмалю, включаючи картопляний крохмаль, карбонатом кальцію, хлоридом натрію, фосфатом кальцію, сульфатом кальцію або фосфатом натрію); гранулюючими і розпушуючими агентами (наприклад, похідними целюлози, включаючи мікрокристалічну целюлозу, крохмалі, включаючи картопляний крохмаль, кроскармелозу натрію, альгірати або альгінову кислоту); з'єднувальні агенти (наприклад, акацієву камедь, альгінову кислоту, альгірат натрію, желатин, крохмаль, прежелатинізований крохмаль, мікрокристалічну целюлозу, карбоксиметилцелюлозу натрію, метилцелюлозу, гідроксипропілметилцелюлозу, етилцелюлозу, полівінілпіролідон, або поліетиленгліколь); і змащувальні агенти, гліданти й антиадгезиви (наприклад, стеаринову кислоту, оксид кремнію або тальк). Інші фармацевтично прийнятні наповнювачі можуть бути барвниками, смаковими агентами, пластифікаторами, зволожувачами, буферними агентами тощо.

Таблетки можуть бути непокритими або вони можуть бути покриті відомими способами, необов'язково для затримки розчинення й абсорбції в шлунково-кишковому тракті, що забезпечує уповільнення дії протягом більш тривалого періоду. Покриття може бути адаптоване для вивільнення активної речовини лікарського засобу в попередньо визначеному патерні (наприклад, для одержання композиції з контрольованим вивільненням) або покриття може бути адаптоване для того, щоб не вивільняти активну речовину лікарського засобу до проходження через шлунок (кишкове покриття). Покриття може бути цукровим покриттям, плівковим покриттям (наприклад таким, в основі якого є гідроксипропілцелюлоза, метилцелюлоза, метилгідроксиетилцелюлоза, гідроксипропілцелюлоза, карбоксиметилцелюлоза, акрилатні співполімери, поліетиленгліколі і/або полівінілпіролідон), або кишковим покриттям (наприклад таким, в основі якого є кополімер метакрилової кислоти, ацетат фталат целюлози, фталат гідроксипропілметилцелюлози, ацетат сукцинат гідроксипропілметилцелюлози, полівінілацетат фталат, шелак й/або етилцелюлоза). Може бути використаний матеріал для затримки за часом, такий як, наприклад, гліцерилмоностеарат або гліцерилдистеарат.

Тверді таблетовані композиції можуть включати покриття, адаптоване для захисту композиції від небажаних хімічних змін (наприклад, хімічної деградації перед вивільненням активної речовини лікарського засобу). Покриття може бути нанесене на тверду дозовану форму так, як це описано в енциклопедії фармацевтичної технології.

Лікарські засоби у таблетці можуть бути змішані разом, або можуть бути розділені. Наприклад, перший лікарський засіб утримується усередині таблетки, а другий лікарський засіб утримується зовні таблетки, так що істотна частина другого лікарського засобу вивільняється перед вивільненням першого лікарського засобу.

Композиції для перорального застосування також можуть бути представлені у вигляді жувальних таблеток, або виді твердих желатинових капсул, де активний інгредієнт змішаний з інертним твердим розчинником (наприклад, картопляним крохмалем, мікрокристалічною целюлозою, карбонатом кальцію, фосфатом кальцію або каоліном), або у вигляді м'яких желатинових капсулах, де активний інгредієнт змішаний з водою або олійним середовищем,

наприклад, рідким парафіном, або маслиною олією. Порошки й грануляти можуть бути отримані за допомогою інгредієнтів, згаданих вище для таблеток і капсул звичайним чином.

Композиції контрольованого вивільнення для перорального застосування можуть бути, наприклад, сконструйовані для вивільнення активного лікарського засобу шляхом контролю розчинення й/або дифузії активної речовини лікарського засобу.

Вивільнення, контрольоване розчиненням або дифузєю, може бути досягнуте відповідним покриттям таблетки, капсули, пелети або гранульованої композиції лікарських засобів, або шляхом включення лікарського засобу у відповідну матрицю. Покриття з контрольованим вивільненням може включати одну або кілька речовин для покриття, згаданих вище, і/або, наприклад, шелак, бджолиний віск, Glucowax, касторовий віск, карнаубський віск, стеариловий спирт, моностеарат гліцерину, дистеарат гліцерину, гліцерин пальмітостеарат, етилцелюлозу, поліакрилати, DL-молочну кислоту, ацетат-бутират целюлози, полівінілхлорид, полівінілацетат, вінілпіролідон, поліетилен, поліметакрилат, метилметакрилат, 2-гідрокси-метакрилат, гідрогелі метакрилату, 1,3-бутиленгліколь, етиленгліколь метакрилату і/або поліетиленгліколі. У складі матриці з контрольованим вивільненням, матеріал матриці може включати, наприклад, гідровану метилцелюлозу, карнаубський віск і стеариловий спирт, карбопол 934, силікон, гліцерил тристеарат, метил акрилат - метил метакрилат, полівініл хлорид, поліетилен і/або галогенований фторовуглеводень.

Композиція з контрольованим вивільненням, яка містить один або кілька лікарських засобів із числа заявлених комбінацій, також може перебувати у вигляді спливаючої таблетки або капсули (тобто таблетки або капсули, яка, при пероральному введенні, плаває на поверхні шлункового вмісту протягом певного періоду часу). Композиція спливаючої таблетки лікарського(их) засобу(ів) може бути отриманий грануляцією суміші лікарського(их) засобу(ів) з наповнювачами й 20-75% мас./мас. гідроколоїдів, таких як гідроксиетилцелюлоза, гідроксипропілцелюлоза, або гідроксипропілметилцелюлоза. Отримані гранули потім можуть бути спресовані в таблетки. При контакті зі шлунковим соком таблетка утворює фактично водонепроникний гелевий бар'єр навколо своєї поверхні. Цей гелевий бар'єр бере участь у підтримуванні щільності меншої, від одиниці, тим самим дозволяючи таблетці залишатися плавучою в шлунковому соку.

Ліпіди для перорального введення

Порошки, дисперговані порошки або гранули, придатні для приготування водної суспензії шляхом додавання води є звичайними дозованими формами для перорального введення. Композиція у вигляді суспензії забезпечує активний інгредієнт у суміші з диспергованим або зволожуючим агентом, суспендуючим агентом і одним або декількома консервантами. Придатними суспендуючими агентами є, наприклад, натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, метилцелюлоза, альгінат натрію тощо.

Парентеральні композиції

Фармацевтична композиція також може бути введена парентерально ін'єкцією, інфузією або імплантацією (внутрішньовенною, внутрішньом'язовою, підшкірною тощо) у дозованих формах, композиціях, або через придатні засоби доставки або імпланти, які містять звичайні, нетоксичні фармацевтично прийнятні носії або ад'юванти. Складання й приготування таких композицій добре відоме фахівцям в галузі фармацевтичних композицій.

Композиції для парентерального застосування можуть бути представлені в одиничних дозованих формах (наприклад, в однодозових ампулах) або у флаконах, які містять кілька доз і в які може бути доданий придатний консервант (див. нижче). Композиція може мати форму розчину, суспензії, емульсії, інфузійного засобу, або засобу доставки для імплантації або може бути представлена у вигляді сухого порошку, відновлюваного перед застосуванням водою, або іншим придатним носієм. Крім активних(ого) лікарських(ого) засобів(у) композиція може включати придатні парентерально прийнятні носії й/або наповнювачі. Активний(і) лікарський(і) засіб(и) може бути введений в мікросфери, мікрокапсули, наночасточки, ліпосоми тощо для контрольованого вивільнення. Композиція може включати суспендуючі, солюбілізуючі, стабілізуючі, рН-коригувальні агенти й/або диспергуючі агенти.

Фармацевтичні композиції запропоновані винаходом можуть мати форму, придатну для стерильної ін'єкції. Для підготовки такої композиції придатний активний(і) лікарський(і) засіб(и) розчиняють або суспендують в парентерально прийнятному рідкому носії. Серед прийнятних носіїв і розчинників, які можуть бути використані - вода, вода із скоректованим до придатного рН шляхом додавання відповідної кількості соляної кислоти, гідроксида натрію, або придатний буфер, 1,3-бутандіол, розчин Рінгера, та ізотонічний розчин хлориду натрію. Водна композиція також може містити один або кілька консервантів (наприклад, метил, етил або n-пропіл p-гідроксибензоат). У випадках, коли один з лікарських засобів лише незначно або слабо

розчинений у воді, може бути доданий агент, який посилює розчинення, або солюбілізує агент, або розчинник може включати 10-60 % пропіленгліколю тощо.

Парентеральні композиції з контрольованим вивільненням можуть мати форму водних суспензій, мікросфер, мікрокапсул, магнітних мікросфер, олійних розчинів, олійних суспензій або емульсій. В іншому випадку, активний(і) лікарський(і) засіб(и) може бути включений в біосумісні носії, ліпосоми, наночасточки, імпланти або засоби для інфузії. Матеріалами для застосування при виготовленні мікросфер і/або мікрокапсул є, наприклад, здатні до біологічної деградації/розкладання полімери, такі як поліглактин, полі-(ізобутил ціаноакрилат), полі(2-гідроксиетил-L-глутамін). Біосумісні носії, які можуть бути використані при складанні парентеральних композицій з контрольованим вивільненням є вуглеводами (наприклад, декстранами), білками (наприклад, альбуміном), ліпопротеїнами або антитілами. Матеріали для застосування в імплантах можуть бути не здатними до біологічної деградації (наприклад, полідиметилсилоксаном) або здатними до біологічної деградації (наприклад, полі(капролактоном), полі(гліколевою кислотою) або полі(орто ефірами)).

Альтернативні шляхи

Можуть розглядатися інші шляхи введення й, отже, інші композиції, хоча вони є гіршими й менш зручними. У зв'язку із цим, для ректального застосування придатні дозовані форми композиції включають супозиторії (типу емульсії або суспензії) і ректальні желатинові капсули (розчини й суспензії). У складі типового супозиторію, активний(і) лікарський(і) засіб(и) поєднуються з відповідною фармацевтично прийнятною основою для супозиторіїв, такою як масло какао, етерифіковані жирні кислоти, гліцериново-кислий желатин і різні водорозчинні або дисперговані основи, подібні до поліетиленгліколів. Можуть бути введені різні добавки, підсилювачі або поверхнево-активні речовини.

Фармацевтичні композиції також можуть бути введені місцево на шкіру для трансдермальною абсорбцією в дозованих формах або композиціях, які містять зазвичай нетоксичні фармацевтично прийнятні носії й наповнювачі, включаючи мікросфери й ліпосоми. Композиції включають креми, мазі, лосьйони, лініменти, гелі, гідрогелі, розчини, суспензії, палички, спреї, пасти, пластирі та інші види систем трансдермальної доставки лікарських засобів. Фармацевтично прийнятні носії або наповнювачі можуть включати емульгуючі агенти, антиоксиданти, буферні агенти, консерванти, зволожувачі, підсилювачі проникнення, хелатуючі агенти, геліформуючі агенти, основи мазей, парфумерію й агенти для захисту шкіри.

Консерванти, зволожувачі, підсилювачі проникнення можуть бути парабенами, такими як метил або пропіл р-гідроксибензоат і хлорид бензалконію, гліцерин, пропіленгліколь, сечовина тощо.

Фармацевтичні композиції, описані вище, для місцевого введення на шкіру, також можуть бути використані в комбінації з місцевим введенням на або близько від тієї частини тіла, яка підлягає лікуванню. Композиції можуть бути адаптовані для прямого застосування або для застосування за допомогою спеціальних обладнань для доставки лікарських засобів, таких як пов'язки або в іншому випадку пластирі, прокладки, губки, стрічки або інші форми придатного гнучкого матеріалу.

Дозування й тривалість обробки

Слід мати на увазі, що лікарські засоби комбінації можуть бути введені одночасно, або по одній, або в різних фармацевтичних композиціях, або послідовно. Якщо застосовується послідовне введення, затримка при введенні наступного (або додаткового) активного інгредієнта не повинна бути такою, щоб втратити перевагу діючого ефекту комбінації активних інгредієнтів. Мінімальна вимога для комбінації відповідно до даного опису полягає в тому, що комбінація повинна бути призначена для об'єднаного застосування з перевагою діючого ефекту комбінації активних інгредієнтів. Цільове застосування комбінації може бути встановлене за допомогою пристосувань, приписань, адаптацій і/або інших засобів, щоб допомогти з використанням комбінації відповідно до винаходу.

Хоча активні лікарські засоби запропоновані даним винаходом можуть бути введені в дробових дозах, наприклад, два або три рази на день, одиночна щоденна доза кожного лікарського засобу в комбінації є більш бажаною, з одиночною щоденною дозою для всіх лікарських засобів в одиночній фармацевтичній композиції (одиночна дозована форма), яка є найбільш бажаною.

- Термін "одиночна дозована форма" відноситься до фізично дискретних одиниць (таких як капсули, таблетки або заповнені циліндри шприців) придатних як унітарні дозування для людей, на яких проводиться випробування, при цьому кожна одиниця містить попередньо визначену кількість активного матеріалу або матеріалів, розрахованих для одержання потрібного терапевтичного ефекту, у комбінації з необхідним фармацевтичним носієм.

Уведення, як правило, повторюють. Уведення може бути здійснене від одного до декількох разів щодня протягом періоду часу від декількох днів до декількох років, і може навіть здійснюватися протягом усього життя пацієнта. Хронічне або, щонайменше, періодично повторюване введення призначають в більшості випадків.

5 Крім того, фармакогеномна (вплив генотипу на фармакокінетичний, фармакодинамічний профіль або профіль ефективності терапевтичного засобу) інформація про конкретного пацієнта може впливати на використане дозування.

10 За винятком відповіді на конкретні випадки погіршення, коли можуть бути необхідні більш високі дозування, бажано дозування кожного лікарського засобу в комбінації буде перебувати в діапазоні доз не вище від дозування, яке звичайно прописується для довгострокового підтримуючого лікування або, щодо якого доведена безпечність у фазі 3 клінічних досліджень.

15 Одна значна перевага винаходу полягає в тому, що кожна сполука може бути використана в низьких дозуваннях у комбінованій терапії, при цьому створюючи, у комбінації, істотну клінічну користь для пацієнта. Комбінована терапія дійсно може бути ефективною в дозах, при яких сполуки окремо фактично не мають ефекту. Відповідно, конкретною перевагою винаходу є можливість застосування кожної із сполук у субоптимальних дозах, тобто дозах, які є нижчими ніж терапевтичні дози, які звичайно прописуються, бажано 1/2 від терапевтичних доз, краще 1/3, 1/4, 1/5, або навіть ще краще 1/10 від терапевтичних доз. У конкретних прикладах, використовуються дози аж до 1/20, 1/30, 1/50, 1/100 або навіть нижче, від терапевтичних доз.

20 При таких субоптимальних дозах, сполуки окремо будуть власне кажучи неактивними, хоча комбінація(ii) запропонована винаходом є повністю ефективною.

Кращі дозування відповідають кількостям від 1 % до аж до 50 % від тих, що звичайно прописують для довгострокового підтримуючого лікування.

25 Найкраще дозування може відповідати кількостям від 1 % аж до 10 % від тих, які звичайно прописують для довгострокового підтримуючого лікування.

Спеціальні приклади дозувань лікарських засобів для застосування у винаході представлені нижче:

30 - бромокріптин перорально від близько 0,01 до 10 мг на день, бажано менше ніж 5 мг на день, краще менше ніж 2,5 мг на день, ще краще менше ніж 1 мг на день, такі дозування є особливо придатними для перорального введення;

- іфенпроділ перорально від близько 0,4 до 6 мг на день, бажано менше ніж 3 мг на день, краще менше ніж 1,5 мг на день, ще краще менше ніж 0,75 мг на день, такі дозування особливо придатні для перорального введення;

35 - мексилетин перорально від близько 6 до 120 мг на день, бажано менше, ніж 60 мг на день, краще менше ніж 30 мг на день, ще краще менше ніж 15 мг на день, такі дозування є особливо придатними для перорального введення;

- моксифлоксацин перорально від близько 4 до 40 мг на день, бажано менше ніж 20 мг на день, краще менше, ніж 10 мг на день, ще краще менше, ніж 5 мг на день, такі дозування є особливо придатними для перорального введення;

40 - торасемід перорально від близько 0,05 до 4 мг на день, бажано менше ніж 2 мг на день, краще менше, ніж 1 мг на день, ще краще менше, ніж 0,5 мг на день, такі дозування є особливо придатними для перорального введення;

45 - триметазидин перорально від близько 0,4 до 6 мг на день, бажано менше, ніж 3 мг на день, краще менше, ніж 1,5 мг на день, ще краще менше, ніж 0,75 мг на день, такі дозування є особливо придатними для перорального введення;

- акампросат перорально від близько 1 до 400 мг на день;

- амінокапронова кислота перорально від близько 0,1 г до 2,4 г на день;

50 - баклофен від 0,01 до 150 мг на день, бажано менше ніж 100 мг на день, краще менше ніж 50 мг на день, найкраще від 5 до 40 мг на день, ще краще менше ніж 35 мг на день, звичайно 15 мг на день, 12 мг на день, 24 мг на день, 30 мг на день, такі дозування є особливо придатними для перорального введення;

- диетилкарбамазин перорально від близько 0,6 до 600 мг на день;

- цинакальцет перорально від близько 0,3 до 36 мг на день;

- цинаризин від близько 0,6 до 23 мг на день;

55 - еплеренон перорально від близько 0,25 до 10 мг на день;

- лефлуномід перорально від близько 0,1 до 10 мг на день;

- левосимендан перорально від близько 0,04 до 0,8 мг на день;

- сульфісоксазол перорально від близько 20 до 800 мг на день;

- сулодексид перорально від близько 0,05 до 40 мг на день;

60 - тербінафін перорально від близько 2,5 до 25 мг на день;

- зонісамід перорально від близько 0,5 до 50 мг на день.

Слід розуміти, що кількість лікарського засобу, яка фактично вводиться, буде визначатися лікарем, з огляду на супровідні обставини, включаючи умови або обставини предмету лікування, точну композицію, що вводиться, вік, масу й відповідь конкретного пацієнта, тяжкість симптомів пацієнта, і обраний шлях уведення. Отже, вищевказані діапазони дозувань призначені для загального орієнтування й підтвердження викладеного в даному документі, але не призначені для обмеження рамок винаходу.

Наведені приклади представлені для ілюстрації й жодним чином не для обмеження.

Приклади

Догляд і утримання тварин, а також експерименти здійснювали відповідно до інструкцій Комітету з досліджень і етичних проблем I.A.S.P. (1983).

А) Лікування захворювань, пов'язаних з токсичністю $A\beta$

У цих серіях експериментів сполуки-кандидати були протестовані щодо їх здатності запобігати або знижувати токсичні ефекти людського $A\beta_{1-42}$. $A\beta_{1-42}$ є повнорозмірним пептидом, з якого складаються агрегати, виявлені в біопсіях пацієнтів-людей, уражених AD. Лікарські засоби спочатку тестували окремо, а потім за допомогою тестів щодо їх комбінованої дії. Ефект визначали на різних типах клітин, для того, щоб додатково документувати активність сполук в *in vitro* моделях, які ілюструють різні фізіологічні ознаки AD. *In vivo* дослідження також здійснювали в мишачій моделі для підтвердження захисного ефекту проти AD, шляхом оцінки ефекту сполук на i) когнітивну діяльність тварин і ii) молекулярні маркери AD (індукція апоптоза, індукція окисного стресу, індукція запального шляху).

I. Сполуки, що пригнічують токсичність людського $A\beta_{1-42}$

I.1. Захист проти токсичності $A\beta_{1-42}$ у моделі мікросудинних ендотеліальних клітин людського мозку

Культури мікросудинних ендотеліальних клітин людського мозку використовували для дослідження захисту, який забезпечує кандидат-сполука(и) у випадку токсичності $A\beta_{1-42}$.

Мікросудинні ендотеліальні церебральні клітини людського мозку (HBMEC, ScienCell Ref: 1000, заморожені на 10 пасажі) швидко розморожували на водяній бані при +37 °C. Надосадову рідину негайно поміщали в 9 мл середовища Ігла, модифікованого Дульбеко ((DMEM; Pan Biotech ref: P04-03600), яке містить 10 % фетальної телячої сироватки (FCS; GIBCO ref 10270-106). Клітинну суспензію центрифугували при 180 × g протягом 10 хвилин при +4 °C і осад суспендували в CSC безсироватковому середовищі (CSC serum free, Cell System, Ref: SF-4Z0-500-R, Партія 51407-4) з 1,6 % "Serum free Rocketfuel" (Cell System, Ref: SF-4Z0-500-R, Партія 54102), 2 % пеніциліну 10 000 Од./мл і стрептоміцину 10 мг/мл (PS; Pan Biotech ref: P06-07100 партія 133080808) і висівали із щільністю 20 000 клітин на комірку в 96 коміркових планшетах (ангіогенна система "matrigel layer biocoat angiogenesis system", BD, Ref 354150, Партія A8662) у кінцевому об'ємі 100 мкл. На основі з матригелю ендотеліальні церебральні клітини спонтанно починали процес морфогенезу капілярної мережі (33).

На стан одержували по три окремі культури, 6 комірок на стан.

Обробка сполуками-кандидатами й людським амілоїдом- β_{1-42}

Коротко, пептид $A\beta_{1-42}$ (Bachem, ref: H1368 batch 1010533) відновлювали в певному культуральному середовищі до 20 μ M (вихідний розчин) і повільно перемішували при +37 °C протягом 3 днів у темряві для агрегації. Контрольне середовище одержували за таких же умов.

Через 3 дні цей агрегований людський амілоїдний пептид використовували на HBMEC у концентрації 2,5 мкМ, розведеним у контрольному середовищі (оптимальний час інкубації). Пептид $A\beta_{1-42}$ додавали через 2 години після розсівання HBMEC на матригель протягом 18 годинної інкубації.

Через одну годину HBMEC розсівали на матригель, тестові сполуки й VEGF-165 розчиняли в культуральному середовищі (+ 0,1 % DMSO) і потім попередньо інкубували з HBMEC протягом однієї години до застосування $A\beta_{1-42}$ (у кінцевому об'ємі на культуральну комірку 100 мкл). Через годину інкубації з тестовими сполуками або VEGF (дві години після розсівання клітин на матригель), 100 мкл пептиду $A\beta_{1-42}$ додавали до кінцевої концентрації 2,5 мкМ, розведеного в контрольному середовищі в присутності тестових сполук або VEGF (у загальному об'ємі 200 мкл/комірку), для того, щоб уникнути подальших розведень лікарського засобу.

Організація культуральних плашок

VEGF-165, відомий як проангіогенна ізоформа VEGF-A, використовували для всіх експериментів у даному дослідженні як еталонну сполуку. VEGF-165 є однією з найпоширеніших ізоформ VEGF, залучених в ангіогенез. VEGF використовували як джерело тестової сполуки при 10 нм.

Наступні стани були піддані оцінці:

- Негативний контроль: середовище окремо + 0,1 % ДМСО
 - Інтوكсикація: амілоїд- β ₁₋₄₂ (2,5 μ M) протягом 18 годин.
 - Позитивний контроль: VEGF-165 (10 нМ) (1 еталонна сполука/культура) 1 година до додавання А β ₁₋₄₂ (2,5 μ M) протягом 18 год періоду інкубування.

5 - Тестові сполуки: Тестові сполуки за 1 годину перед додаванням А β ₁₋₄₂ (2,5 μ M) протягом 18 год. періоду інкубування.

Кількісний аналіз капілярної мережі

10 На комірку робили по 2 зображення за допомогою InCell Analyzer™ 1000 (GE Healthcare) у режимі світлової трансмісії з 4 × збільшенням. Усі зображення одержували за однакових умов. Аналіз мереж ангиогенеза здійснювали за допомогою програмного забезпечення Developer (GE Healthcare). Оцінювали загальну довжину капілярної мережі.

Обробка даних

15 Усі значення виражені як середнє (s.e. середнє 3 культур (n = 6 на стан). Статистичні аналізи проводили за інших умов (шляхом здійснення дисперсійного аналізу, потім критерію Даннета, коли це можливо, програма (Statview software version 5.0). Значення (як %) вставляли в графіки, що демонструють еволюцію токсичності амілоїду. Фактично амілоїдна токсичність була взята за 100 %, а вплив тестових речовин розраховували як % цієї амілоїдної токсичності.

Результати

20 Результати представлено на Фігурі 2. Вони продемонстрували, що лікарські засоби окремо індукують істотний захисний ефект проти токсичності, викликаной пептидом А β ₁₋₄₂:

- Торасемід, у низькому дозуванні, наприклад, 400 нМ, індукує сильний захисний ефект;
- Бромокріптин, у низькому дозуванні, наприклад, 3,2 нМ, індукує сильний захисний ефект.

25 Результати також показують, що, несподівано, верхня або нижня концентрації лікарських засобів у порівнянні з вище згаданими концентраціями лікарських засобів, можуть погіршити або мають менший ефект або ефект на токсичність А β ₁₋₄₂ у даній моделі відсутній.

І.2 Захист проти токсичності А β ₁₋₄₂ на первинні кортикальні нейрональні клітини

Обробка тестовою речовиною й людським амілоїдом β ₁₋₄₂

30 Щурячі кортикальні нейрони культивували як описано Singer et al. (42). Коротко, вагітних самок пацюків з 15 денними вагітностями забивали зсувом шийних хребців (Rats Wistar) і видаляли плоди з матки. Кортекс видаляли й поміщали в крижане середовище Лейбовіца (L15), яке містить 2 % пеніциліну 10 000 Од./мл і стрептоміцину 10 мг/мл і 1% бичачого сироваткового альбуміну (BSA). Кору дисоціювали трипсином протягом 20 хвилин при 37 °C (0,05 %). Реакцію зупиняли додаванням модифікованого Дульбекко середовища Ігла (DMEM), яке містить ДНКАзу І категорії II і 10 % фетальної телячої сироватки (FSC). Клітини потім механічно дисоціювали 35 серійними пасажами через 10 мл піпетку й центрифугували при 515 × g протягом 10 хвилин при +4 °C. Надосадову рідину відкидали й осад клітин ресуспендували в певному культуральному середовищі, яке містить Neurobasal, збагаченому B27 (2 %), L-глутаміном (0,2 мМ), 2% розчином PS і 10 нг/мл BDNF. Живі клітини підраховували в цитометрі Neubauer за допомогою тесту виключення трипанового синього. Клітини висівали при щільності 30 000 клітин/комірку в 40 96 комірових планшетах (комірки попередньо покривали за допомогою полі-L-лізину (10 мкг/мл)) і культивували при +37 °C у зволоженій повітряній (95 %)/CO₂ (5 %) атмосфері.

Коротко, пептид А β ₁₋₄₂ відновлювали в певному культуральному середовищі в концентрації 40 мкМ (вихідний розчин) і повільно струшували при +37 °C протягом 3 днів у темряві для агрегації. Контрольне середовище одержували за таких же умов.

45 Через 3 дні розчин використовували на первинних кортикальних нейронах у такий спосіб:

Через 10 днів культивування нейронів, лікарський засіб розчиняли в культуральному середовищі (+0,1% ДМСО) і потім попередньо інкубували з нейронами протягом 1 години перед застосуванням А β ₁₋₄₂ (у кінцевому об'ємі на культуральну комірку 100 мкл). Через одну годину інкубації лікарського засобу(в), 100 мкл пептиду А β ₁₋₄₂ додавали в кінцевій концентрації 100 мкМ розведених у присутності лікарського засобу(ів), для того, щоб уникнути подальшого розведення лікарських засобів. Кортикальні нейрони інтоксичували протягом 24 годин. На стан 50 були отримані по три окремі культури, 6 комірок на стан.

BDNF (50 нг/мл) і естрадіол- β (150 нм) використовували як позитивний контроль й еталонні сполуки, відповідно.

55 Організація культуральних плашок

Естрадіол- β у концентрації 150 нм використовували як позитивний контроль.

Естрадіол- β розчиняли в культуральному середовищі й попередньо інкубували протягом 1 години для застосування з агрегованим амілоїдом β ₁₋₄₂.

Наступні стани були піддані оцінці:

60 - КОНТРОЛЬНА ПЛЯМА: 12 комірок/стан

- Негативний контроль: середовище окремо + 0,1% ДМСО
- Інтотоксикація: амілоїд - β 1-42 (10 мкМ) протягом 24 годин
- Еталонна сполука: Естрадіол (150 нМ) 1 год.
- ПЛАНШЕТ З ЛЕКАСТВЕННИМ ЗАСОБОМ: 6 комірок/стан

- 5
- Негативний контроль: середовище окремо + 0,1% ДМСО
 - Інтотоксикація: амілоїд - β 1-42 (10 мкМ) протягом 24 годин
 - Лікарський засіб: лікарський засіб -1 год. потім амілоїд β 1-42 (10 мкМ) протягом 24 годин
- Тест активності лактатдегідрогенази (LDH)

- 10
- Через 24 години після інтоксикації надосадову рідину відокремлювали й аналізували за допомогою набору для детекції цитотоксичності (LDH, Roche Applied Science, обліковий номер: 11644793001, партія: 11800300). Цей колориметричний тест для кількісного визначення клітинної цитотоксичності заснований на вимірюванні активності лактатдегідрогенази, вивільненої із цитозолу вмираючих клітин у надосадову рідину.

Обробка даних

- 15
- Усі значення виражені як середнє (s.e. середнє 3 культур (n=6 на стан). Статистичні аналізи здійснювали за інших умов (дисперсійний аналіз, потім критерій Даннета, коли це можливо, програма Statview, версія 5.0).

Результати

- 20
- Результати, отримані для індивідуальних обраних лікарських засобів в аналізах токсичності на первинних кортикальних нейрональних клітинах, представлено на Фігурах 2, 26 і 27. Вони продемонстрували, що лікарські засоби окремо індукують істотний захисний ефект проти токсичності, викликаній пептидом $A\beta_{1-42}$:

- 25
- триметазидин, у низькому дозуванні, наприклад, 40 нМ, індукує сильний захисний ефект;
 - мексилетин, уже в дозуванні 3,2 нМ, індукує сильний захисний ефект;
 - бромкріптин, уже в дозуванні 40 нМ, індукує сильний захисний ефект;
 - іфенпроділ, уже в дозуванні 3,2 нМ, індукує сильний захисний ефект;
 - моксифлоксацин, уже в дозуванні 20 нМ, індукує сильний захисний ефект.
 - торасемід, у дозуванні 200 нМ, індукує сильний захисний ефект.
 - Гомотаурин, у дозуванні 8 нМ, індукує сильний захисний ефект.

- 30
- Отримані результати також несподівано показують, що, концентрації лікарських засобів вищі й нижчі від тих, що зазначені раніше, можуть погіршити або мають менший ефект або захисний ефект проти токсичності $A\beta_{1-42}$ на нейрональних клітинах відсутній.

II. Комбіновані терапії запобігають токсичності людського $A\beta_{1-42}$

- 35
- II.1 Вплив комбінованих терапій на токсичність людського пептиду $A\beta_{1-42}$ на людських клітинах НВМЕС.

Ефективність комбінації лікарських засобів запропонованих винаходом оцінювали на людських клітинах. Протокол, який використовується в цих тестах, є таким же, що і описаний у розділі I.1 вище.

Результати

- 40
- Усі протестовані комбінації лікарських засобів дають захисний ефект проти токсичності людського пептиду $A\beta_{1-42}$ на моделі НВМЕС, як показано в Таблиці 3 нижче й проілюстровано у Фігурах 3-6 і Фігурах 13-14. Результати ясно показують, що інтоксикація агрегованим людським амілоїдним пептидом ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ М) значимо пригнічується комбінаціями запропонованими винаходом, тоді як за цих концентрацій лікарські засоби окремо не проявляють значимого ефекту на інтоксикацію за експериментальних умов, описаних вище.
- 45

Таблиця 3

Комбінація лікарських засобів	Захисний ефект у клітинах НВМЕС, інтоксикованих $A\beta_{1-42}$
баклофен і торасемід	+
еплеренон і торасемід,	+
бромокріптин і сульфісоксазол,	+
сульфісоксазол і торасемід	+
тербінафін і торасемід,	+
мексилетин і цинакальцет	+
баклофен і триметазидин і торасемід,	+
баклофен і цинакальцет і торасемід	+
баклофен і акампросат і торасемід	+
сульфісоксазол і триметазидин і торасемід і зонісамід	+
сульфісоксазол і мексилетин і торасемід і цинакальцет	+
баклофен і акампросат і торасемід і диетилкарбамазин	+
баклофен і акампросат і торасемід і диетилкарбамазин і іфенпроділ	+
левосимендан і баклофен і триметазидин	+
левосимендан і амінокапроєва кислота й триметазидин	+
левосимендан і тербінафін і триметазидин	+
левосимендан і сульфісоксазол і триметазидин	+

5 Наведені як приклади на Фігурах 3-6, 13 і 14 наступні комбінації лікарських засобів дають особливо цікаві захисні ефекти проти токсичності людського пептиду $A\beta_{1-42}$ при інтоксикації клітин НВМЕС:

- баклофен і торасемід;
- сульфісоксазол і торасемід;
- 10 - торасемід і еплеренон;
- сульфісоксазол і бромокріптин;
- тербінафін і торасемід, або
- цинакальцет і мексилетин.

15 II.2β Вплив комбінованих терапій на токсичність людського пептиду A_{1-42} на первинних кортикальних клітинах

Ефективність комбінацій лікарських засобів винаходу оцінювали на первинних кортикальних нейрональних клітинах. Протокол, який використовується в цих тестах, є таким же, як і описаних у розділі I.2 вище.

Результати

20 Усі протестовані комбінації лікарських засобів мали вплив проти токсичності людського пептиду $A\beta_{1-42}$ у первинних кортикальних нейрональних клітинах, як показано в Таблиці 4 нижче й проілюстровано на Фігурах 7-12 і 16-22. Результати ясно показують, що інтоксикація агрегованим людським амілоїдним пептидом ($A\beta_{1-42}$ 10 мкм) значимо пригнічується комбінаціями запропонованими винаходом, тоді як за цих концентрацій лікарські засоби окремо

25 не проявляють значимого ефекту на інтоксикацію експериментальних умов, описаних вище.

Таблиця 4

Комбінація лікарських засобів	Захисний ефект в інтоксикованих $A\beta_{1-42}$ первинних кортикальних нейрональних клітинах
акампросат і іфенпроділ	+
баклофен і мексилетин	+
баклофен і триметазидин	+
баклофен і торасемід	+
цинакальцет і мексилетин	+
цинаризин і триметазидин	+
триметазидин і зонісамід	+
левосимендан і мексилетин	+
левосимендан і іфенпроділ	+
левосимендан і триметазидин	+
левосимендан і моксифлоксацин	+
мексилетин і іфенпроділ	+
моксифлоксацин і баклофен	+
моксифлоксацин і цинакальцет	+
моксифлоксацин і триметазидин	+
моксифлоксацин і сульфісоксазол	+
моксифлоксацин і зонісамід	+
торасемід і сульфісоксазол	+
баклофен і триметазидин і торасемід	+
баклофен і цинакальцет і торасемід	+
баклофен і акампросат і торасемід	+
сульфісоксазол і триметазидин і торасемід і зонісамід	+
сульфісоксазол і мексилетин і торасемід і цинакальцет	+
баклофен і акампросат і торасемід і диетилкарбамазин	+
баклофен і акампросат і торасемід і диетилкарбамазин і іфенпроділ	+
левосимендан і баклофен і триметазидин	+
левосимендан і амінокапроєва кислота й триметазидин	+
левосимендан і тербінафін і триметазидин	+
левосимендан і сульфісоксазол і триметазидин.	+

5 Наведені як приклади на Фігурах 7-12, 15-22 наступні комбінації лікарських засобів дають особливо цікаві захисні ефекти проти токсичності людського пептиду $A\beta_{1-42}$ в інтоксикації клітин НВМЕС:

- акампросат і іфенпроділ;
- баклофен і мексилетин;
- 10 - баклофен і торасемід;
- баклофен і триметазидин;
- цинакальцет і мексилетин;
- цинаризин і триметазидин;
- 15 - триметазидин і зонісамід;
- мексилетин і іфенпроділ;
- моксифлоксацин і баклофен;
- моксифлоксацин і цинакальцет;
- моксифлоксацин і триметазидин;
- моксифлоксацин і сульфісоксазол;
- 20 - моксифлоксацин і зонісамід, або
- торасемід і сульфісоксазол.

11. Захист росту нейритів від токсичності $A\beta_{1-42}$

Тестові сполуки й обробка $A\beta_{1-42}$

Первинні щурячі кортикальні нейрони культивували як описано раніше.

Після 10 днів у культурі, клітини інкубували з лікарськими засобами. Через 1 годину клітини інтоксичували 2,5 мкМ бета-амілоїдом (1-42; Bachem) у визначеному середовищі без BDNF, але разом з лікарськими засобами. Кортикальні нейрони інтоксичували протягом 24 годин. BDNF (10 нг/мл) використовували як позитивний (нейропротективний) контроль. На стан були отримані по три окремі культури, 6 комірок на стан.

Довжина нейритів

Після 24 годин інтоксикації, надосадову рідину відокремлювали й кортикальні нейрони фіксували холодним розчином етанолу (95 %) і оцтової кислоти (5 %) протягом 5 хв. Після пермеабілізації 0,1 % сапоніном, клітини блокували протягом 2 годин за допомогою PBS, що містить 1 % фетальну телячу сироватку. Потім клітини інкубували з моноклональним антитілом проти 2 білка, асоційованого з мікротрубочками (microtubule-associated-protein 2, MAP-2; Sigma). Це антитіло виявляли за допомогою козячого антитіла проти мишачих IgG, міченого Alexa Fluor 488 (Molecular probe). Ядра нейронів мітили за допомогою флуоресцентного маркера (Hoechst solution, SIGMA).

На комірку робили 10 знімків за допомогою аналізатора InCell Analyzer™ 1000 (GE Healthcare) з 20 × збільшенням. Усі знімки одержували за однакових умов. Аналіз мережі нейритів здійснювали за допомогою програмного забезпечення Developer (GE Healthcare) для оцінки загальної довжини мережі нейритів.

Результати

Комбінація баклофену й торасеміду індукує значимий захисний ефект проти токсичності людського пептиду A β ₁₋₄₂ (збільшення мережі нейритів на 531 %) у первинних кортикальних нейрональних клітинах, як показано на Фігурі 23. Результати ясно показують, що інтоксикація людським амілоїдним пептидом (A β ₁₋₄₂ 2,5 μ M) значимо пригнічується комбінацією, і що, однак, комбінація підсилює мережу нейритів у порівнянні з контролем.

Отже, дана комбінація дозволяє ефективно захищати кортикальні нейрональні клітини й клітини нейрональної мережі проти токсичності людського пептиду A β ₁₋₄₂. Більше того, таке збільшення мережі нейритів підтверджує ефективність таких лікарських засобів у неврологічних розладах, таких як ураження спинного мозку.

III. Сполуки запобігають токсичності людського A β ₂₅₋₃₅ in vivo

Тварини

Протягом всього дослідження використовували самців мишей Swiss. Тварин розміщали в пластикових клітинах, з вільним доступом до лабораторного корму й води, за винятком поведінкових експериментів, і тримали в регульованому середовищі, при 12 год. циклі чергування світла й темряви (світло вмикалося в 8 ранку). Поведінкові експерименти проводили у звуконепроникній експериментальній кімнаті з регульованою циркуляцією повітря, до якої мишам давали звикнути, щонайменше, протягом 30 хвилин перед кожним експериментом.

Одержання й ін'єкція амілоїдного пептиду

Пептид A β ₂₅₋₃₅ і скрембльований пептид A β ₂₅₋₃₅ розчиняли в стерильній бідистильованій воді, їх зберігали при -20 °C до застосування. Спостереження за допомогою світлової мікроскопії показало, що інкубування пептиду A β ₂₅₋₃₅, але не скрембльованого пептиду A β ₂₅₋₃₅ приводить до появи двох типів нерозчинних преципітатів, двоякозаломяючих фібрил-подібних структур і аморфних кулястих агрегатів. β -амілоїдні пептиди потім вводили інтрацеребровентрикулярно (i.c.v.). Коротко, кожну мишу злегка анестезували за допомогою ефіру, вставляли сталеву голку унілатерально в 1 мм праворуч від точки серединної лінії, рівновіддаленої від кожного ока, на рівній відстані між очами й вухами й перпендикулярно до площини черепа. Пептиди або носії доставляли поступово протягом приблизно 3 с. Миші демонструють нормальну поведінку в межах 1 хв. після ін'єкції. Ділянку введення перевіряли ін'єкцією індійського чорнила в попередніх експериментах. Ні вставляння голки, ні ін'єкція носія, не мали значимого впливу на виживання, поведінкові відповіді й когнітивні функції.

Обробка лікарською(ими) сполукою(ами)

У день 1, тобто через 24 години до ін'єкції пептиду A β ₂₅₋₃₅, лікарські засоби, комбінації лікарських засобів, або розчин-носій вводили перорально зондом двічі на день (в 8 ранку й 6 вечора).

На 10 день (в 10 ранку) мишам проводили ін'єкцію i.c.v. пептид A β ₂₅₋₃₅ або скрембльований пептид A β ₂₅₋₃₅ (контроль) у кінцевому об'ємі 3 мкл (3 мМ).

Між днем 0 і днем 7, лікарські засоби, комбінація лікарських засобів або розчин-носій вводили перорально зондом двічі на день (в 8 ранку й 6 вечора). Одна тварина групи одержувала донепезил (еталонну сполуку, 1 мг/кг/день) перорально зондом, однієї ін'єкцією (в 8 ранку). Лікарські засоби солюбілізували у воді й готували заново перед кожним зондовим введенням.

На день 7 усіх тварин тестували на ефективність спонтанного чергування в тесті з Y-подібним лабіринтом, за показником просторової робочої пам'яті.

На день 7 або 8, контекстуальна довгочасна пам'ять тварин оцінювалася за допомогою процедури пасивного уникнення понижувального типу.

5 На 8 день мишей забивали. Їхні мізки піддавали диссекції й зберігали при -80 °C до подальшого аналізу.

Позитивні результати спостерігали в поведінкових активностях і біохімічних тестах, здійснених через 7 днів після і.с.в. ін'єкції пептиду A β ₂₅₋₃₅, а саме для комбінацій, перерахованих у Таблиці 5.

10

Таблиця 5

Комбінація лікарських засобів	Результати біохімічних і/або поведінкових тестів
баклофен і торасемід	+
мексилетин і цинакальцет	+
сульфісоксазол і торасемід	+
баклофен і триметазидин і торасемід	+
баклофен і цинакальцет і торасемід	+
баклофен і акампросат і торасемід	+
сульфісоксазол і триметазидин і торасемід і зонісамід	+
сульфісоксазол і мексилетин і торасемід і цинакальцет	+
баклофен і акампросат і торасемід і диетилкарбамазин	+
баклофен і акампросат і торасемід і диетилкарбамазин і іфенпроділ	+
левосимендан і баклофен і триметазидин	+
левосимендан і амінокапроєва кислота й триметазидин	+
левосимендан і тербінафін і триметазидин	+
левосимендан і сульфісоксазол і триметазидин	+

IV. Сполуки підсилюють поведінкові й когнітивні активності інтоксикованих тварин

Тварин інтоксичували як зазначено в розділі вище.

15 Ефективність спонтанного чергування - Тест в Y-подібному лабіринті.

На день 7, усіх тварин тестували на ефективність спонтанного чергування в Y-подібному лабіринті, показнику спонтанної робочої пам'яті. Y-подібний лабіринт виготовлений із сірого полівінілхлориду. Кожне плече має довжину 40 см у довжину, 13 см у висоту, і 3 см завширшки внизу, 10 см завширшки вгорі, і плечі сходяться в одній точці з рівним кутом. Кожну мишу поміщали в кінці одного плеча й дозволяли вільно пересуватися по лабіринту протягом 8-ми хвилинної сесії. Серії заходів у плечі, включаючи можливі повернення в одне й теж плече, перевіряли візуально. Чергування визначається як заходи в усі три плеча в кожному наступний випадок заходу. Кількість максимальних чергувань, отже, є загальним числом заходів у плечі, мінус два, а відсоток чергування розраховується як (фактичні чергування/максимальні чергування) × 100. Параметри включають відсоток чергування (показник пам'яті) і загальна кількість заходів у плечі (показник дослідження). Тварини, які демонстрували екстремальну поведінку (відсоток альтернатив < 25 % або > 85 % або кількість заходів в "плечі" лабіринту < 10), відбраковувалися. Як правило, відбраковування становило 0-5 % тварин. Цей тест зокрема служить для аналізу внеску поведінкового рівня й амнезійного ефекту, індукованого в мишах за допомогою ін'єкції A β ₂₅₋₃₅.

30 Тест умовного рефлексу пасивного уникнення

Обладнання є двокамерною (15 × 20 × 15 см у висоту) коробкою з однієї камерою, освітлюваною білими полівінілхлоридними стінками, і з іншою камерою, затемненою чорним полівінілхлоридними стінками й сітчастою підлогою. Двері-гільйотина відділяє камери. 60-ти ватна лампа, розташована в 40 см, над обладнанням освітлює світлу камеру в процесі експерименту. Рандомізовані електробольові подразнення лабетів тварин (0,3 мА протягом 3 секунд) можуть бути здійснені на сітчастій підлозі за допомогою генератора шоку з перемішувачем (Lafayette Instruments, Лафейетт, США). Підйомні двері початково закриті протягом тренувальної сесії. Кожну мишу поміщали в світлу камеру. Через 5 секунд двері піднімалися. Коли миша входила в затемнену камеру й поміщала всі свої лабету на сітчасту

40

підлогу, двері закривалася й протягом 3 секунд здійснювалося електробильове подразнення. Покрокову затримку, тобто, затримку, витрачену на вхід у затемнену камеру, і кількість вокалізацій, записували. Тест утримання проводили через 24 год. після тренування. Кожну мишу знову поміщали в світлу камеру. Через 5 секунд двері піднімали, покрокову затримку й затримку втечі, тобто час, витрачений на повернення в світлу камеру, записували аж до 300 секунд.

Позитивні результати спостерігали для кожної із протестованих комбінацій, перерахованих у таблиці 6.

Таблиця 6

Комбінація лікарських засобів	Тест в Y-подібному лабіринті	Пасивне уникнення	
		Затримка втечі	Покрокова затримка
баклофен-торасемід	+	+	+
баклофен-акампросат-торасемід	+	+	+
мексилетин і цанакальцет	+	+	+
сульфісказол і торасемід	+	+	+

V. Сполуки запропоновані винаходом поліпшують нейрофізіологічне розуміння неврологічних захворювань

Комбіновані терапії тестувалися в in vivo моделі інтоксикації Аβ. Оцінювали їхній вплив на деякі параметри, які порушені в неврологічних захворюваннях:

- Рівень експресії каспаз 3 і 9, розглянутий як індикатор апоптоза;
- Перекісне окиснення ліпідів, розглянуте як маркер рівня окисного стресу;
- Тест експресії GFAP, розглянутої як маркер рівня запалення в мозку;
- Цілісність гематоенцефалічного бар'єра;
- Загальна цілісність синапсів (тІФА на синаптофізин).

Цілісність гематоенцефалічного бар'єра

Експериментальний дизайн інтоксикації тварин за допомогою Аβ був таким же, що й у частині III.

Потенційний захисний ефект комбінованих терапій на цілісність гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ) аналізували в мишах, ін'єктованих інтречеребровентрикулярно (i.c.v.) олігомерним амілоїд-β₂₅₋₃₅ пептидом (Аβ₂₅₋₃₅) або скрембльованим Аβ₂₅₋₃₅ контрольним пептидом (Sc.Аβ), через 7 днів після ін'єкції.

На день 7 після ін'єкції Аβ₂₅₋₃₅ тваринам, тестували за допомогою способу з ЕВ (Evans Blue) цілісність ГЕБ. Відомо, що барвник ЕВ зв'язується із сироватковим альбуміном після периферійної ін'єкції й використовується як засіб відстеження сироваткового альбуміну.

Барвник ЕВ (2% у сольовому розчині, 4 мл/кг) проводили ін'єкцію внутрішньоочеревинно (в.о.) за 3 години перед транскардіальною перфузією. Мишей анестезували за допомогою в.о. 200 мкл попередньої суміші кетаміну 80 мг/кг, ксилазину 10 мг/кг, розкривали грудну клітку. Мишей перфузували транскардіально за допомогою 250 мл сольового розчину протягом приблизно 15 хв. доти, поки рідина із правого передсердя не ставала безбарвною. Після декапітації, мозок видаляли й піддавали дисекції в трьох областях: кора головного мозку (ліва + права), гіпоталамус (лівий + правий), диенцефалон. Потім кожну область мозку зважували для кількісного вимірювання екстравазації ЕВ-альбуміну.

Зразки гомогенізували у фосфатно-сольовому буферному розчині й змішували на вортексі після додавання 60 % трихлороцтової кислоти для осадження білка. Зразки охолоджували при 4 °С, потім центрифугували 30 хвилин при 10 000 g, 4 °С. Надосадову рідину вимірювали при 610 нм для поглинання ЕВ за допомогою спектрофотометра.

ЕВ кількісно оцінювали і як

- мкг/кг тканини мозку за допомогою стандартної кривої, отриманої за допомогою відомої концентрації ЕВ-альбуміну.

- мкг/кг білка.

Як згадано в Таблиці 7, комбіновані терапії запропоновані винаходом ефективні для підтримання цілісності ГЕБ у порівнянні з необробленими інтоксикованими тваринами.

Загальна цілісність синапсів (тІФА на синаптофізин)

Синаптофізин були обраний як маркер цілісності синапсів і тестувався за допомогою комерційного набору тІФА (USCN, Ref. E90425Mu). Зразки одержували із тканин гіпоталамуса й гомогенізували в екстракційному буфері, як описано виробником і у відповідній літературі.

Тканини промивали крижаним PBS (0,02 моль/л, рН 7,0-7,2) для повного видалення надлишку крові й зважували перед заморожуванням в азоті й зберіганні при -80 °С. Тканини розрізали на малі шматки й гомогенізували в 1 мл крижаному фосфатно-сольовому буфері (PBS) за допомогою скляного гомогенізатора. Отриману суспензію обробляли звуком за допомогою ультразвукового клітинного дезінтегратора в ході двох циклів заморожування-розморожування для подальшого руйнування клітинних мембран. Потім гомогенати центрифугували протягом 5 хвилин при 5000 g і надосадову рідину оцінювали негайно.

Усі зразки тестували в трьох повторностях.

Кількісну оцінку білків здійснювали за допомогою набору для визначення кількості білка з BCA (біцинхоніновою кислотою) Pierce (Pierce, Ref. #23227) для оцінки ефективності екстракції й здійснення нормалізації.

Загальні концентрації білка потім розраховували з розведень стандартної кривої й використовували для нормалізації результатів tІФА.

Результати (Таблиця 7) демонструють, що комбіновані терапії є ефективними для підтримання загального рівня синаптофізину в мозку оброблених тварин, у порівнянні з необробленими інтоксикованими тваринами.

Тест окисного стресу

Мишей забивали декапітацією і обоє гіпокампа швидко видаляли, зважували й зберігали в рідкому азоті до тестування. Після разморозки гіпоталам гомогенізували в холодному метанолі (1/10 мас./об.) центрифугували при 1000 g протягом 5 хвилин і надосадову рідину, поміщали в пробірку Еппендорф. Реакційний обсяг кожного гомогената додавали до 1 мм Feso₄, 0,25 M H₂SO₄, 1 мм ксиленолового жовтогогарячого й інкубували протягом 30 хвилин за кімнатної температури. Після зчитування при 580 нм (A₅₈₀ 1), 10 мкл 1 мм кумол гідропероксида (CHP) додавали до зразка й інкубували протягом 30 хвилин за кімнатної температури, для визначення максимального рівня окиснення. Поглинання вимірювали при довжині хвилі 540 нм. Рівень ліпідного перекисного окиснення визначається як еквіваленти CHP (CHPE) згідно: CHPE = A₅₈₀ 1/A₅₈₀ 2 × [CHP] і виражали у вигляді еквівалентів CHP на масу тканини і як відсоток даних контрольної групи.

Результати (таблиця 7) показують, що комбіновані терапії є ефективними в зниженні загального окисного стресу, індукованого Аβ у мозку оброблених тварин, у порівнянні з необробленими інтоксикованими тваринами.

Тест індукції каспазного шляху й тест експресії GFAP

Мишей забивали декапітацією і обидва гіпокампа швидко видаляли, промивали в крижаному PBS (0,02 моль/л, рН 7,0-7,2) для повного видалення надлишку крові, зважували й зберігали в рідкому азоті до тестування. Тканини розрізали на малі шматки й гомогенізували в 1 мл крижаному PBS за допомогою скляного гомогенізатора. Отриману суспензію обробляли звуком за допомогою ультразвукового клітинного дезінтегратора в ході двох циклів заморожування-відтавання для подальшого руйнування клітинних мембран. Потім гомогенати центрифугували при 5000 g протягом 5 хвилин і надосадову рідину оцінювали негайно.

Експерименти проводили за допомогою комерційного тесту Каспаза-3 (USCN-E90626Mu), Каспаза-9 (USCN-E90627Mu), GFAP (USCN-E90068).

Кількісну оцінку білків здійснювали за допомогою набору для визначення кількості білка з BCA (біцинхоніновою кислотою) Pierce (Pierce, Ref. #23227) для оцінки ефективності екстракції й здійснення нормалізації.

Результати (таблиця 7) демонструють, що комбіновані терапії впливають на маркери апоптоза й запалення в мозку оброблених тварин, у порівнянні з необробленими інтоксикованими тваринами.

Таблиця 7

Комбінація лікарських засобів	Каспазний шлях	Окисний стрес	Експресія GFAP	Цілісність ГЕБ	Загальна цілісність синапсів
баклофен-торасемід	+	+	+	+	+
баклофен-акампросат-торасемід	+	+	+	+	+
мексилетин і цанакальцет	+	+	+	+	+
сульфісоксазол і торасемід	+	+	+	+	+

В) запобігання токсичності глутамату на нейронах

5 У цій додатковій серії експериментів сполуки-кандидати тестували щодо їхньої здатності запобігати або редукувати токсичні ефекти глутаматної токсичності не нейрональні клітини. Глутаматна токсичність задіяна в патогенезі неврологічних захворювань або розладів, таких як розсіяний склероз, хвороба Альцгеймера, бічний аміотрофічний склероз, хвороба Паркінсона, хвороба Хантінгтона, невропатії, алкоголізм або алкогольна абстиненція, або ураження спинного

10 мозку. Лікарські засоби спочатку тестувалися окремо, а потім проводилися тести на їхню комбіновану дію.

Способи

Ефективність комбінацій лікарських засобів запропонованих винаходом оцінювали на первинних кортикальних нейрональних клітинах. Протокол, який використовується в цих тестах, є таким же, як і описаний у розділі A.I.2 вище.

15

Тести токсичності глутамату

Нейропротективний ефект сполук оцінювали шляхом кількісної оцінки нейритної мережі (фарбування нейрофіламентів (NF)), яка специфічно виявляє глутаматергічні нейрони.

Через 12 днів культури нейронів, лікарські засоби кандидатних комбінацій розчиняли в культуральному середовищі (+0,1 % ДМСО). Кандидатні комбінації потім попередньо інкубували з нейронами протягом 1 години до ураження глутаматом. Через одну годину інкубації, глутамат додавали протягом 20 хвилин, до кінцевої концентрації 40 мкМ, у присутності кандидатних комбінацій, для того, щоб уникнути подальшого розведення лікарських засобів. Наприкінці інкубації, середовище заміняли на середовище з кандидатною комбінацією, але без глутамату.

20

25 Культуру фіксували через 24 години після ураження глутаматом. МК801 (дизоциплін малеат, 77086-22-7 - 20μM) використовували як позитивний контроль.

Після пермеабілізації сапоніном (Sigma), клітини блокували протягом 2 годин за допомогою PBS, що містить 10 % козячої сироватки, потім клітини інкубували за допомогою мишачого моноклонального первинного антитіла проти антитіла до нейрофіламентів (NF, Sigma). Це антитіло виявляли за допомогою козячого антитіла проти мишачих IgG, кон'югованого з Alexa Fluor 488.

30

Ядра клітин мітили за допомогою флуоресцентного маркера (Hoechst solution, SIGMA), і оцінювали кількісно мережа нейритів. По шість комірок на стан використовували для оцінки нейронального виживання, в 3 різних культурах.

Результати

Усі протестовані комбінації лікарських засобів дають захисний ефект проти токсичності глутамату для кортикальних нейрональних клітин. Результати показано в Таблиці 8 нижче.

Як проілюстровано Фігурами 24 і 25, комбінації запропоновані винаходом краще захищають нейрони від глутаматної токсичності за експериментальних умов, описаних вище. Примітно, що ефективний захист згадується за допомогою концентрацій лікарських засобів, при яких лікарські засоби, використані окремо, не мали значимого або мали низький захисний ефект.

40

Таблиця 8

Комбінація лікарських засобів	Нейропротективний ефект проти токсичності глутамату
баклофен-торасемід	+
баклофен-акампросат-торасемід	+
мексилетин і цанакальцет	+
сульфісоксазол і торасемід	+

5 С) поліпшення при інших розладах, пов'язаних з ексайтотоксичністю глутамату, за допомогою комбінацій винаходу

Вищезгаданий *in vitro* захисний ефект проти токсичності глутамату лікарських засобів і комбінацій запропонованих винаходом, у комбінації із захисними ефектами, проілюстрованими в даному документі на декількох моделях AD, спонукали винахідників перевірити ці лікарські засоби в деяких моделях інших захворювань, у патології яких також залучена глутаматна токсичність, таких як MS, ALS і невропатичний біль.

10 І) Захисний ефект комбінацій в *in vivo* моделі розсіяного склерозу

15 Модель, в якій у мієлін-олігодендроцит глікопротеїн-імунізованих (MOG-імунізованих) мишей, розвивається хронічний прогресивний EAE, використовувалася для демонстрації сприятливого ефекту композицій запропонованих винаходом при лікуванні розсіяного склерозу.

Тварини й хімічні речовини

20 Миші-самки C57L/6J (8-ми тижневі) були придбані в Janvier (Франція); після двох тижнів адаптації, у самок мишей (10-ти тижневі) розвивається хронічний параліч після імунізації пептидом MOG (мієлін-олігодендроцит глікопротеїн). Експериментальний енцефаломієліт індукується за допомогою набору Hooke Kit MOG₃₅₋₅₅/CFA Emulsion PTX (коклюшний токсин) для індукції EAE (EK-0110, EK-0115; Hooke laboratories). Контрольним набором є CK-0115 (Hooke laboratories).

Порядок проведення експерименту

Експериментальний енцефаломієліт індукували наступною процедурою:

25 У день 0, здійснювали дві підшкірні ін'єкції 0,1 мл кожного; одну у верхню частину спини миші, а іншу - у нижню частину спини. Кожна ін'єкція містить 100 мкг пептид MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK), 200 мкг інактивованого Mycobacterium tuberculosis H37Ra емульгованих у повному ад'юванті Фрейнда (CFA) (Hooke laboratories). Емульсія забезпечує антиген, необхідний для поширення й диференціювання MOG-специфічних аутоімунних Т-клітинах.

30 Дві внутрішньоочеревинні ін'єкції 500 нг коклюшного токсину в PBS (набір Hooke) здійснювали через 2 години (день 0) і 24 години (день 1) після ін'єкції MOG. Коклюшний токсин підсилює розвиток EAE шляхом забезпечення додаткового ад'юванта.

35 У мишей через 8 днів після імунізації розвивається EAE і залишаються хронічно паралізованими протягом експерименту. Після імунізації мишей щодня спостерігали на предмет клінічних симптомів у сліпій процедурі. Тварин тримали у звичайному безпатогенному технічному блоці, і всі експерименти проводили відповідно до інструкцій, описаних, або дозволених офіційним місцевим комітетом з біоетики.

Експериментальні групи й обробка лікарським засобом:

40 Групи самок мишей, як описано, гомогенізували за масою перед імунізацією:

- Контрольна група: ін'єкція носія за тих же умов мишам з EAE (від дня 1 до дня 28, щодня давали плацебо).

- Група EAE: Ін'єкція MOG (день 0) + ін'єкції коклюшного токсину (день 0 і 1) - від дня 1 до дня 28, щодня перорально дається плацебо.

45 - EAE + позитивний контроль: ін'єкція MOG (день 0) + ін'єкції коклюшного токсину (день 0 і 1) - від дня -1 до дня 28, щодня перорально давали дексаметазон.

- EAE + група лікування: ін'єкція MOG (день 0) + ін'єкції коклюшного токсину (день 0 і 1). Обробки починаються за день перед імунізацією й закінчуються до дня 28.

Клінічні бали вимірювали в дні 0-5-8-9-12-14-16-19-21-23-26-28.

50 Повсюдно використовували програмне забезпечення Statistica (Statsoft Inc.) для статистичного аналізу. Дисперсійний аналіз і тест Ст'юдента використовували для аналізу клінічного бала захворювання. $P < 0,05$ розглядали як значимий.

Затримки виникнення захворювання, клінічний бал і відтермінування смерті, порівнювали між кожною групою з еталонною "imtm" групою за допомогою кривих Каплана-Мейера й моделі Коксу (пакет R "виживання"). Отримані р-значення є односторонніми й тест гіпотези на покращення у порівнянні з еталонною "imtm" групою.

- 5 Загальний клінічний бал складається з бала хвоста, бала задніх кінцівок, бала передніх кінцівок і бала сечового міхура, як описано нижче:

Бал хвоста:

Бал=0	Нормальна миша утримує свій хвіст піднятим при русі.
Бал=1	Якщо край хвоста відвисає з тенденцією до падіння.
Бал=2	Якщо хвіст повністю відвисає й падає на стіл.

10

Бал задньої кінцівки:

Бал=0	Нормальна миша має енергійну ходу й не волочить свої лабети
Бал=1	Кожний з наступних тестів є позитивним: А - Тест на перекидання: утримуючи хвіст між великим і вказівним пальцями, перевернути тварину на спину й засікати час, потрібний тварині для того, щоб перевернутись. Здорова миша буде перевертатися негайно. Затримка припускає слабкість задніх кінцівок. В - Помістити мишу на верхню сітку клітки й спостерігати, як вона перетне її з однієї сторони на іншу. Якщо одна або обидві кінцівки часто прослизують між планками, то вважають, що є частковий параліч.
Бал=2	Обидва попередніх тести є позитивними.
Бал=3	Одна або обидві задні кінцівки мають ознаки паралічу, але деякі рухи зберігаються; наприклад: тварина може хапатися й утримуватися на нижній стороні верхньої сітки клітки протягом короткого часу, перед тем, як відпустити.
Бал=4	Коли обидві задні ноги паралізовані й миша тягне їх при русі.

Бал передніх кінцівок:

15

Бал=0	Нормальні миші використовують свої передні лабети для захоплення й руху й утримують свою голову піднятою.
Бал=1	Рух є можливим, але утрудненим внаслідок слабості однієї або обох лабет, наприклад, передні лабети вважаються слабкими, коли миша має труднощі з захватом на нижній стороні верхньої сітки клітки. Іншою ознакою слабості є опускання голови.
Бал=2	Коли одна передня кінцівка паралізована (неможливість хапатися за що-небудь і миша повертається навколо паралізованої кінцівки). У цей час голова втрачає більшу частину свого м'язового тону.
Бал=3	Миша не може рухатися, а їжа й вода недосяжні.

Бал сечового міхура

Бал=0	Нормальна миша повністю контролює свій сечовий міхур.
Бал=1	Уважається, що миша страждає нетриманням, якщо її нижня частина тіла просочена сечею.

20

Загальний бал для кожної тварини визначали додаванням усіх вищевказаних категорій. Максимальний бал для живих тварин дорівнював 10.

Результати - комбіновані терапії ефективні в моделі MS.

Значиме поліпшення глобального клінічного бала спостерігається в мишей "групи обробки EAE+", а саме для комбінацій, перерахованих у таблиці 9.

Таблиця 9

Комбінація лікарських засобів	Поліпшення загального клінічного бала в ЕАЕ-тварин
баклофен-торасемід	+
баклофен-акампросат-торасемід	+
мексилетин і цанакальцет	+
сульфісоксазол і торасемід	+

11. Захисний ефект комбінацій у моделі ALS

5 Комбіновані терапії згідно із даним винаходом протестовані *in vitro*, у моделі спільно культивування, і *in vivo*, у мишачій моделі ALS. Протоколи й результати представлені в даному розділі.

II.1 Захисний ефект проти токсичності глутамату в первинних культурах нервово-мускульної спільної культури

Первинні спільні культури нервових і м'язових клітин

10 Людський м'яз одержували згідно з раніше описаним способом із частини біопсій здорового пацієнта (44). М'язові клітини одержували з дисоційованих клітин (10000 клітин на комірку), розсівали на покритих желатином 0,1 % на 48 коміркового планшети й ростили на проліферуючому середовищі, яке містить суміш середовища MEM і середовища M199.

15 Відразу після злиття DRG необхідні для досягнення гарного співвідношення іннервацій. Іннервовані культури підтримували в змішаному середовищі. Через 24 години при звичайному спільному культивуванні нейритів спостерігали ріст експлантів спинного мозку. Вони можуть контактувати з м'язовими трубочками й індують перші скорочення через 8 днів. Відразу після цього, іннервовані м'язові волокна розташовані в безпосередній близькості від експлантів спинного мозку, і практично безупинно скорочуються. Іннервовані волокна морфологічно просторово відрізняються від неіннервованих волокон і можуть бути легко відрізані від решти.

20 Завершене одне спільне культивування (6 комірок на стан).

Ураження глутаматом

25 На день 27, спільні культури інкубували із сполуками-кандидатами або рилузолем за одну годину перед інтоксикацією глутаматом (60 мкм) протягом 20 хвилин. Потім спільні культури промивали й сполуки-кандидати або рилузол додавали протягом додаткових 48 годин. Після цього часу інкубації, нефіксовані спільні культури інкубували з α -бунгаротоксином, з'єднаним з Alexa 488, у концентрації 500 нмоль/л протягом 15 хвилин за кімнатної температури. Потім спільні культури фіксували PFA протягом 20 хвилин за кімнатної температури. Після пермеабілізації 0,1 % сапоніном, спільні культури інкубували з антитілом проти нейрофіламентів (NF).

30 Ці антитіла визначаються за допомогою Alexa Fluor 568 козячого антитіла проти мишачих IgG (Molecular probe). Ядра нейронів позначені флуоресцентним маркером (Hoechst solution).

35 Кінцевими точками є (1) загальна довжина нейритів, (2) кількість моторних одиниць, (3) загальна площа моторних одиниць, яка є показовою для виживання й функціональності мотонейронів.

Для кожного стану робили 2 × 10 знімків за допомогою аналізатора InCell Analyzer™ 1000 (GE Healthcare) з 20 × збільшенням. Усі зображення одержували за однакових умов.

Результати

40 Лікарські засоби запропоновані винаходом ефективно захищають мотонейрони й моторні одиниці в моделі спільного культивування.

Таблиця 10

Комбінація лікарських засобів	Захисний ефект проти інтоксикації глутаматом у спільних м'язових/нервових культурах
баклофен-торасемід	+
баклофен-акампросат-торасемід	+
мексилетин і цанакальцет	+
сульфісоксазол і торасемід	+

II.2 - Комбіновані терапії ефективні в мишачій моделі ALS

Експерименти проводили на самцях мишей. Самців трансгенних мишей B6Sjl-tg(SOD1)2Gur/J і їх контроль (відповідно, SN2726 і SN2297, з Jackson Laboratories, Бен-Харбор, США, дистрибуцією яких у Франції займається Charles River) були обрані для цього набору експериментів для імітації ALS.

5 Хворі миші експресують трансген SOD1-G93A, сконструйований з мутантного людського гена SOD1 (одиначна амінокислотна заміна гліцину на аланін у кодоні 93), керованого за допомогою свого ендogenous людського промотору SOD1. Контрольні миші експресують контрольний людський ген SOD1.

Уведення лікарського засобу

10 Мишам вводили дози лікарських кандидатів, розведених у носії з 60 дня після народження й до смерті. Розведені розчини лікарських засобів-кандидатів одержували за допомогою води за кімнатної температури відразу перед початком введення.

- У питній воді:

15 Рилузол додавали в питну воду в кінцевій концентрації 6 мг/мл (корегували до середньої маси тіла кожної групи) в 5 % циклодекстрині. Оскільки миші випивали близько 5 мл/день, оціночно доза, що вводиться, становить 30 мг/кг/день, яка є дозою, яка, як було показано, збільшує виживання мишей.

- Циклодекстрин використовували як носій в кінцевій концентрації 5 %, розведений водою за кімнатної температури зі стокового розчину (циклодекстрин 20 %).

20 - Пероральне введення (через рот):

- Комбінації лікарських засобів вводили перорально щодня.

- Циклодекстрин використовували як носій в кінцевій концентрації 5 %, розведений водою за кімнатної температури зі стокового розчину (циклодекстрин 20 %).

Клінічне спостереження

25 Клінічне спостереження для кожної миші проводили щодня, з першого дня обробки (60-ти денний вік) до смерті (або забоювання). Клінічне спостереження включає вивчення поведінкових тестів: початок паралічу, "втрата при розведенні", "втрата рефлексу перекидання" і загальне спостереження за ходом:

- виникнення паралічу: спостереження включає спостереження паралічу в кожній кінцівці.

30 Виникнення паралічу відповідає дню перших ознак паралічу.

- Тест втрати при розведенні задніх кінцівок включає реєстрацію тремору або тремтіння й положення задніх кінцівок (обвисання або перекошування), коли миші утримуються за хвіст.

35 - У тесті втрати рефлексу перекидання оцінювали здатність мишей перевертатись протягом 30 секунд при повороті на будь-яку сторону. Рефлекс перекидання втрачений, коли миша нездатна перевернути себе. Втрата рефлексу перекидання визначається в кінцевій стадії захворювання: миші, нездатні перевернутись, піддаються евтаназії.

Результати - Комбіновані терапії ефективні в in vivo моделі ALS

40 Поліпшення захворювання спостерігається у хворих тварин, оброблених за допомогою лікарських засобів і комбінацій лікарськими засобами запропонованими винаходом. Відзначимо, що комбінації лікарських засобів, перераховані в таблиці 11, ефективно поліпшують клінічний бал цих тварин в процесі різних стадій захворювання.

Таблиця 11

Комбінація лікарських засобів	Вплив на клінічний бал у хворих тварин
баклофен-торасемід	+
баклофен-акампросат-торасемід	+
мексилетин і цанакальцет	+
сульфісоксазол і торасемід	+

45 III) Захисний ефект комбінацій винаходу в індукованій оксаліплатиною невропатії, як in vivo моделі невропатичного болю

Комбіновані терапії запропоновані даним винаходом протестовані in vivo, у придатній моделі периферійної невропатії, тобто гострої моделі оксаліплатин-індукованої невропатії й хронічної моделі оксаліплатин-індукованої невропатії. Тварини, протоколи й результати представлені в даному розділі.

50 Утримання тварин

Використовували пацюків Спрага-Дулі (CERJ, Франція), з масою 150-175 г на початку експериментів обробки оксаліплатиною (D₀). Тварин розміщали в технічному блоці для роботи із тваринами з обмеженим доступом у кімнаті з контрольованою температурою (19,5 °C - 24,5 °C) і

відносною вологістю (19,5 °C - 24,5 °C) при 12 год. циклі зміни світла/темряви, з необмеженим доступом до стандартного гранульованого лабораторного корму й води протягом усього дослідження. Тварин розміщували по 4 або 5 на клітку й протягом тижневого періоду акліматизації спостерігали перед будь-яким тестуванням.

5 План експерименту:

Чотири наступні групи пацюків використовували у всіх експериментах:

Контрольні групи:

Група 1: Носій оксаліплатину (дистильована вода), в.о. /Носій кандидатної(их) комбінації(й) (дистильована вода), п.о. щодня.

10 Група 2: Оксаліплатин (дистильована вода), в.о. /носій кандидатної(их) комбінації(й) (дистильована вода), п.о. щодня.

Група 3: Оксаліплатин 3 мг/кг в.о./одиначний лікарський засіб у дистильованій воді, п.о. щодня × 9.

Протестована композиція групи:

15 Група 4: Оксаліплатин 3 мг/кг в.о./кандидатна(і) комбінація(ії) у дистильованій воді, п.о. щодня × 9.

Група 5 6 оксаліплатин 3 мг/кг в.о./габапентин (100 мг/кг) у дистильованій воді, перорально в дні тестування (тобто D₁ і D₈);

20 Носій і тестовані одиниці доставляли щодня з D-1 по D7 (за день до останнього дня тестування), тоді як габапентин вводили в дні тестування (за 120 хвилин перед тестом).

Усі обробки проводили в задованому й випадковому порядку, коли це можливо. Дози виражені за показником вільної активної речовини.

Індукція невропатії

25 Гостру невропатію індукували одиначною внутрішньоочеревинною ін'єкцією оксаліплатину (3 мг/кг).

Хронічну периферійну невропатію індукували повторними внутрішньоочеревинними ін'єкціями оксаліплатину (3 мг/кг, в.о.) у дні 0, 2, 4 і 7 (CD=12 мг/кг, в.о.). Хронічна невропатія в людей є кумулятивною, а також найчастіше зустрічається в пацієнтів, які одержували загальні дози оксаліплатину > або =540 мг/м², які відповідають ~15 мг/кг у вигляді кумулятивної дози в пацюків (Cersosimo R.J. 2005).

Оксаліплатин-індукована хвороблива невропатія в пацюків відтворює болючі симптоми в пацієнтів, підданих лікуванню оксаліплатином:

- Термічна гіпералгезія є найбільш раннім симптомом. Її можна вимірювати за допомогою ацетонового тесту або за допомогою тесту із зануренням хвоста;

35 - Механічна гіпералгезія з'являється пізніше. Вона може бути кількісно оцінена за допомогою тесту фон Фрея або тесту тиску на лапу.

Дозування й тестування тварин

40 Усі комбінації лікарських засобів вводили від дня перед першою внутрішньоочеревинною ін'єкцією оксаліплатину 3 мг/мл (D-1) і продовжували вводити перорально до D7. Протягом днів тестування (тобто D1 і D7), комбінації лікарських засобів вводили після тесту. Тваринам із групи, обробленої еталоном (габапентин), введення здійснювалися тільки в дні тестування.

Ацетоновий тест

45 Холодову алодинію оцінювали за допомогою ацетонового тесту шляхом вимірювання відповідей на термічну неболючу стимуляцію в D1 (близько 24 годин після першої ін'єкції оксаліплатину 3 мг/кг (гострий ефект оксаліплатину) і D8 (хронічний ефект оксаліплатину).

В ацетоновому тесті, затримка відсмикування задньої лапи вимірюється після нанесення краплі ацетону на плантарну поверхню обох задніх лабетів (час реакції) і підраховується інтенсивність відповіді (холодний бал). Час реакції на ефект охолодження ацетону вимірюється в межах 20 секунд (час відсікання) після нанесення ацетону. Відповіді на ацетон також грабуються за наступною 4-пунктною шкалою: 0 (немає відповіді); 1 (швидке відсмикування, ривок лабети); 2 (продовжане відсмикування або помітний ривок лабети); 3 (повторний ривок лабети з облизуванням або кусанням).

Для кожної експериментальної групи результати виражені як:

55 Час реакції визначається як час, виражений в секундах, необхідний для виявлення реакції лабети (середнє 6 вимірів для кожного пацюка разом з ± SEM).

Кумулятивний холодний бал, визначений як сума 6 балів для кожного пацюка разом ± SEM. Мінімальний бал, що становить 0 (немає відповіді на кожний з 6 випробувань), а максимальний можливий бал становить 18 (повторний ривок і вилизування або кусання лабетів, у кожному із шести випробувань).

60 Статистичний аналіз

Здійснювали тест Ст'юдента, однобічний, 3 типу. Значимий рівень установили як $p < 0,05$; усі групи порівнювали із групою захворювання+носії (група, оброблена оксаліплатином). Середні й середньоквадратична похибка середнього показані на фігурах.

Результати

- 5 Оксаліплатин індукує значиме зниження часу реакції відсмикування лабети після нанесення ацетону (хвора група + носій) залежно від часу. Це зниження є прогресивним і значимим від дня 1 (гостра модель невропатії, індукованої оксаліплатином) по день 8 (хронічна модель) у порівнянні із групою, що одержувала носій.
- 10 - Антиалодинічний ефект у гострій моделі оксаліплатин-індукованої невропатії
- 10 Комбінації лікарських засобів, протестованих у гострій моделі оксаліплатин-індукованої невропатії оцінювали за допомогою ацетонового тесту. У Таблиці 12 представлені комбінації лікарських засобів (Група 4), яка індукує значиме зниження в кумулятивному холодному балі й значимо зниження часу реакції в порівнянні із групою, обробленою оксаліплатиною-носієм (Група 2). У висновку необхідно відзначити, що ці лікарські комбінації захищають тварин від
- 15 гострої невропатії, індукованої оксаліплатином.

Таблиця 12

Комбінації лікарських засобів у моделі гострої невропатії (Група 4)	Варіація холодного бала в порівнянні із Групою 2	Час реакції в порівнянні із групою 2	Антиалодинічний ефект
баклофен-торасемід	зменшення	збільшення	+
баклофен-акампросат-торасемід	зменшення	збільшення	+
мексилетин і цанакальцет	зменшення	збільшення	+
сульфісоксазол і торасемід	зменшення	збільшення	+

+ = антиалодинічний ефект, отриманий у Групі 3 пацюків, після аналізу кумулятивних холодних балів і аналізу часу реакції в ацетонових тестах, у гострій моделі, індукованої оксаліплатином.

- Антиалодинічний ефект у хронічній моделі оксаліплатин-індукованої невропатії

- 20 Комбінації лікарських засобів, використаних у хронічній моделі оксаліплатин-індукованої невропатії, оцінювали за допомогою ацетонового тесту.
- 25 У таблиці 13 представлені комбінації лікарських засобів, для яких, час реакції й холодний бал в ацетоновому тесті, обмірюваний у Групі 4 (тварини, оброблені за допомогою комбінацій лікарських засобів і оксаліплатину), відповідно, значимо підвищуються й знижуються після обробки в моделі хронічної невропатії в порівнянні із групою, обробленою оксаліплатином-носієм (Група 2). У висновку необхідно відзначити, що ці лікарські комбінації захищають тварин від хронічної невропатії, індукованої оксаліплатином.

Таблиця 13

Комбінації лікарських засобів, протестованих у хронічній моделі невропатії (Група 4)	Варіація холодного бала в порівнянні із Групою 2	Час реакції в порівнянні із групою 2	Антиалодинічний ефект
баклофен-торасемід	зменшення	збільшення	+
баклофен-акампросат-торасемід	зменшення	збільшення	+
мексилетин і цанакальцет	зменшення	збільшення	+
сульфісоксазол і торасемід	зменшення	збільшення	+

+ = антиалодинічний ефект, отриманий у Групі 3 пацієнтів, після аналізу кумулятивних холодних балів і аналізу часу реакції в ацетонових тестах, у хронічній моделі, індукованої оксаліплатиною.

5 IV) Композиції на основі баклофену-торасеміду стимулюють регенерацію нервів у нейротоксованих клітинах

- Нейротрофічні ефекти комбінації баклофену-торасеміду in vitro

Тест довжини нейритів

10 Оцінку росту нейритів в 10-ти денних культурах щурячих кортикальних клітин здійснювали за допомогою антитіл MAP-2 як згадано в розділі А) II.4, за винятком того, що клітини не експонувалися яким-небудь токсичним речовинам. 10-ти денні клітинні культури інкубували з лікарськими засобами протягом 1 дня перед тестом.

Результати

15 Як показано на Фігурі 28, комбінація баклофену-торасеміду демонструє значимий нейротрофічний ефект (+11 %), тоді як індивідуальні лікарські засоби, при використанні окремо, не проявляють якого-небудь значимого нейротрофічного ефекту. Дійсно, значиме збільшення загальної довжини нейритів у межах нейрональної мережі (мічені MAP2-2) спостерігається при експонуванні комбінації баклофену-торасеміду (400 nM і 80 nM, відповідно). Відмітимо, що ні комбінація, ні лікарські засоби окремо не проявляють впливу на кількість нейронів, таким чином, підкреслюючи, що дане збільшення мережі нейритів пов'язане з подовженням існуючих нейритів і стимуляцією de novo подовжень нейрональних клітин.

20 Ці результати підтверджують, що комбінація баклофену-торасеміду є ефективною для підтримання подовження аксонів і в такий спосіб ефективна при лікуванні ураження спинного мозку й інших уражень нервів. Це підтверджує також, що комбінація ефективна при лікуванні спадкових нейропатій, що підтверджують або аксональний, або демієлінізуючий, або й аксональний, і демієлінізуючий компонент. Дійсно, слід уважати, що демієлінізація викликає дестабілізацію аксона, що приводить до дегенерації аксонів, яка спостерігається навіть при невропатіях, які вважаються в основному демієлінізуючою формою.

25 - Композиції на основі баклофену-торасеміду ефективні при активації регенерації нервів in vivo

Здавлення сідничного нерва широко прийняте як валідна модель ураження периферійного нерва й для оцінки регенерації нервів. У даній моделі, uszkodження нерва приводить до швидкого руйнування нервової функції, про що свідчить міра викликаного потенціалу м'язової дії (СМАР), генерованого за допомогою стимуляції ураженого сідничного нерва.

35 Ураження нерва характеризується більш низькою провідністю нервом сигналу, який приводить до збільшення затримки при утворенні СМАР і порушеною силою потенціалу дії, що дає знижену амплітуду й тривалість.

40 Як правило, перші ознаки відновлення нервової функції відбуваються протягом 2 тижнів, і на 4 тижень після uszkodження, значна ремієлінізація регенованих аксонів спостерігається в сідничному нерві за допомогою гістології (45).

Здавлення нерва

45 Мишей анестезували ізофлураном (2,5-3 % у повітрі). Праве стегно потім голили й сідничний нерв експонували на рівні середини стегна й здавлювали в 5 мм проксимальніше біфуркації сідничного нерва. Нерв здавлювали протягом 10 с двічі за допомогою мікрозатискачів (Holtex,

reference P35311) з 90° поворотом між кожним здавлюванням. Для псевдооперованих тварин, сідничні нерви експонували, але не здавлювали. Нарешті, шкірний розріз забезпечували раневими кліпсами. День здавлювання розглядається як день 0.

Графік дозування

5 День здавлювання, перше введення компонентів здійснювали через 30 хвилин після здавлювання.

Сполуки потім вводили двічі на день, від дня після здавлювання й протягом 42 днів. У межах одного дня, введення лікарських засобів були розділені проміжком, щонайменше, 6 годин.

У тестові дні (дні 7 і 30) мишам здійснювали введення за 1 год. 30 хв. перед тестом.

10 Об'єм введення становив 10 мл/кг, в 0,25% ДМСО/стерильної води.

	Доза 1 (bid)	Доза 2 (bid)	Доза 3 (bid)
Баклофен (+/-)	3 мг/кг	3 мг/кг	3 мг/кг
Торасемід	25 мкг/кг	100 мкг/кг	400 мкг/кг

Вимірювання електроміографії

15 Зняття електрофізіологічних даних здійснювали за допомогою електроміографа Keypoint (EMG) (Medtronic, Франція) на день 7 і день 30. Мишей анестезували 2,5-3 % ізофлураном у повітрі. Підшкірні монополярні голчасті електроди використовували як для стимуляції, так і для запису. Супрамаксимальні (12,8 мА) прямокутні імпульси тривалістю 0,2 мс використовували для стимуляції сідничного нерва. Правий сідничний нерв (іспілатеральний) стимулювали за допомогою одиночного пульсу, застосованого до сідничної вирізки. СМАР записували голчастими електродами, поміщеними на м'язи гомілки. Початок (затримку) сигналу СМАР, виражений в мілісекундах використовували для оцінки швидкості провідності нерва. Затримка, таким чином, відображає ступінь мієлінізації аксонів. Також визначали амплітуду потенціалу дії (μV), яка відбиває рівень денервації й реінервації м'язів. Амплітуда СМАР у цей час дається як пропорційна до кількості регенерованих моторних аксонів. Також була визначена тривалість викликаного м'язового потенціалу. Амплітуда й тривалість викликаного м'язового потенціалу більш пов'язана з м'язовою реінервацією. Затримка й амплітуда звичайно збігаються як найбільш важливі кінцеві точки у випадку нервової регенерації. Дані аналізували за допомогою білатерального, 3 типу, t-критерію Ст'юдента; значимий рівень встановлено при $p < 0,05$.

Результати

30 Комбінації баклофену-торасеміду є ефективними у всіх протестованих дозах, зі значимо поліпшеною тимчасовою затримкою сигналу в порівнянні із тваринами, обробленими носієм, і це вже відбувається на сьомий день після ураження нерва (ФіГУРА 29, А). Значима відмінність усе ще спостерігається на 30-й день після здавлювання нерва, коли звичайно спостерігається початок спонтанного відновлення.

35 Статистично значиме поліпшення в амплітуді сигналу також спостерігається для Дози 3 на 30 день після здавлювання нерва (Фігура 29, В). Таке поліпшення також спостерігається, але меншою мірою, для доз 1 і 2. Схожі результати спостерігаються при вимірюванні тривалості сигналу.

40 У цілому, ці *in vivo* результати демонструють ефективність комбінації баклофену-торасеміду при стимуляції нервової регенерації за допомогою ремієлінізації й м'язової реінервації. Тому *in vivo* експериментальні дані підтверджують нейротрофічні ефекти баклофену-торасеміду, які спостерігаються *in vitro*, та їхню корисність при корекції невропатій, коли ушкодженими є нерви периферійної нервової системи (тобто невропатій, визначених в описі), але також при ураженні спинного мозку.

Список літератури

1. Crook R. et al. (1998). A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nat Med.* 4 (4): 452-5.
2. Houlden H., Baker M., et al. (2000). Variant Alzheimer's disease with spastic paraparesis and cotton wool plaques is caused by PS-1 mutations that lead to exceptionally high amyloid-beta concentrations. *Ann Neurol.* 48 (5):806-8.
3. Kwok J.B., Taddei K., et al. (1997). Two novel presenilin-1 mutations in early-onset Alzheimer's disease pedigrees and preliminary evidence for association of presenilin-1 mutations with a novel phenotype. *Neuroreport.* 8 (6):1537-42.
4. Verkkoniemi A., Kalimo H., et al. (2001). Variant Alzheimer disease with spastic paraparesis: neuropathological phenotype. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60 (5):483-92.
5. Citron M. (2004). Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 5 (9):677-85.

6. Suh Y.H. and Checler F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev.* 54 (3):469-525.

7. Glenner G.G., Wong C.W., et al. (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol.* 2 (6):357-69.

8. Ballatore C., Lee V.M., et al. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8 (9):663-72.

9. Bell K.F. and Claudio Cuello A. (2006). Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 545 (1):11-21.

10. Hardy J.A. and Higgins G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256 (5054):184-5.

11. Braak H. and Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82 (4):239-59.

12. Golde T.E. (2005). The Abeta hypothesis: leading us to rationally-designed therapeutic strategies for the treatment or prevention of Alzheimer disease. *Brain Pathol.* 15 (1):84-7.

13. Hardy J. and Selkoe D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297 (5580):353-6.

14. Selkoe D.J. (2000). The genetics and molecular pathology of Alzheimer's disease: roles of amyloid and the presenilins. *Neurol Clin.* 18 (4):903-22.

15. Zlokovic B. V., The Blood Brain Barrier In Health And Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron review.* 2008, 57, 178-201.

16. Budd Haeberlein, S.L. and S.A. Lipton, Excitotoxicity in neurodegenerative disease, in *Encyclopedia of neuroscience*, L.R. Squire, Editor. 2009, Elsevier. p. 77-86.

17. Hughes, J.R., Alcohol withdrawal seizures. *Epilepsy Behav.* 2009. 15 (2):p. 92-7.

18. Kim, A.H., G.A. Kerchner, and C. DW, Blocking Excitotoxicity, in *CNS Neuroprotection*, F.W. Marcoux and D.W. Choi, Editors. 2002, Springer: New York. p. 3-36.

19. Hama A, Sagen J., Antinociceptive effect of riluzole in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *J Neurotrauma.* 2011 Jan.; 28 (1):127-34.

20. Lees, K.R., et al., Glycine antagonist (gavestinel) in neuroprotection (GAIN International) in patients with acute stroke: a randomised controlled trial. *GAIN International Investigators. Lancet,* 2000. 355 (9219):p. 1949-54.

21. Malgouris, C., et al., Riluzole, a novel antglutamate, prevents memory loss and hippocampal neuronal damage in ischemic gerbils. *J Neurosci,* 1989. 9 (11):p. 3720-7.

22. Wahl, F., et al., Effect of riluzole on focal cerebral ischemia in rats. *Eur J Pharmacol,* 1993. 230 (2): p. 209-14.

23. Wahl, F., et al., Riluzole reduces brain lesions and improves neurological function in rats after a traumatic brain injury. *Brain Res,* 1997. 756 (1-2):p. 247-55.

24. Ettmayer, P., Amidon, G. L., Clement, B. & Testa, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.* 47, 2393-2404 (2004).

25. Beaumont, K., Webster, R., Gardner, I. & Dack, K. Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. *Curr. Drug Metab.* 4, 461-485 (2003).

26. Heimbach, T. et al. Enzyme-mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs. *Int. J. Pharm.* 261, 81-92 (2003).

27. Yang, C. Y., Dantzig, A. H. & Pidgeon, C. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm. Res.* 16, 1331-1343 (1999).

28. Steffansen, B. et al. Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 3-16 (2004).

29. Stella, V. et al. *Prodrugs: Challenges and Rewards* (AAPS, New York, 2007).

30. Wermuth, CG. *The Practice of Medicinal Chemistry.* (Hardbound, 2003). Part VI, Chap 33: Designing prodrugs and bioprecursors.

31. Pezron, I. et al. Prodrug strategies in nasal drug delivery. *Expert Opin. Ther. Pat.,* Vol. 12, No. 3, 331-340 (2002).

32. Stella, V. J. Prodrugs as therapeutics. *Expert Opin. Ther. Pat.* 14, 277-280 (2004).

33. Stella, V. J. & Nti-Addae, K. W. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 677-694 (2007).

34. Higuchi, T.; Stella, V. eds. *Prodrugs As Novel Drug Delivery Systems.* ACS Symposium Series. American Chemical Society: Washington, DC (1975). 31.

35. Roche, E. B. *Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs.* American Pharmaceutical Association: Washington, DC (1977).

36. Lal, R., et al., Arbaclofen placarbil, a novel R-baclofen prodrug: improved absorption, distribution, metabolism, and elimination properties compared with R-baclofen. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. 330 (3):p. 911-21.

37. Andrew R. Leach, Valerie J. Gillet. *An Introduction to Chemoinformatics*. Springer 2007.

5 38. S. Asad Rahman, M. Bashton, G. L. Holliday, R. Schrader and J. M. Thornton: Small Molecule Subgraph Detector (SMSD) Toolkit, *Journal of Cheminformatics* 2009, 1:12 doi:10.1186/1758-2946-1-12.

39. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, Gautam B, Hassanali M. Drugbank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res*. 36, Issuesuppl 1. D901-D906 (2008).

10 40. Stahl H., Wermuth C. G. (Eds.) *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*. Wiley-vch; 2 edition (March 29, 2011).

41. Hanafi R, Mosad S, Abouzid K, Niess R, Spahn-Langguth H. Baclofen ester and carbamate prodrug candidates: a simultaneous chromatographic assay, resolution optimized with Drylab. *J Pharm Biomed Anal*, 2011. 56 (3):p.569-76.

15 42. Singer C., Figueroa-Masot X., Batchelor R., and Dorsa D. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J. Neuroscience*, 1999. 19 (7):2455-2463.

43. Feng Xu, Ge Peng, Thu Phan, Usha Dilip, Jian Lu Chen, Tania Chernov-Rogan, Xuexiang Zhang, Kent Grindstaff, Thamil Annamalai, Kerry Koller, Mark A. Gallop, David J. Wustrow, Discovery of a novel potent GABAB receptor agonist; *Bioorg Med Chem Lett*. 2011 Nov. 1; 21 (21):6582-5.)

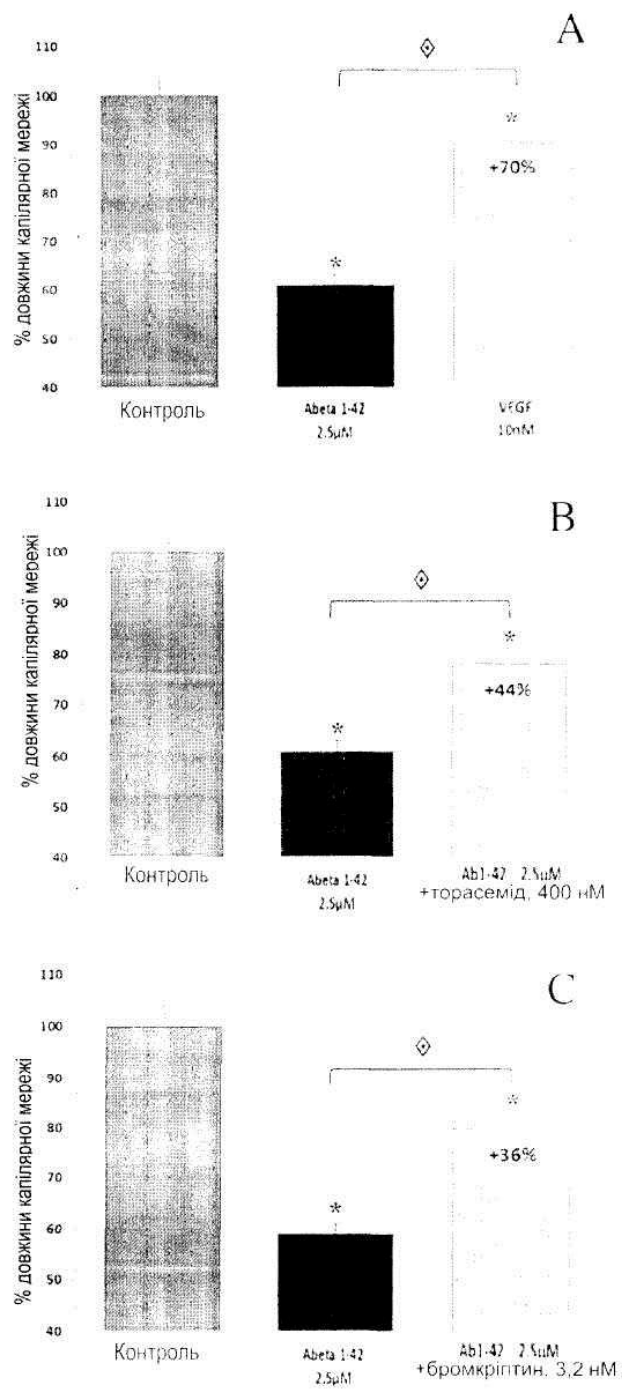
20 44. Braun S, Croizatb B, Lagrange MC, Wartera JM, Poindron P. Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord-human muscle cocultures. Volume 136, Issues 1-2, March 1996, Pages 17-23.

25 45. Bordet T, Buisson B, Michaud M, Drouot C, Galéa P, Delaage P, Akentieva NP, Evers AS, Covey DF, Ostuni MA, Lacapère JJ, Massaad C, Schumacher M, Steidl EM, Maux D, Delaage M, Henderson CE, Pruss RM. Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Aug.; 322 (2):709-20.

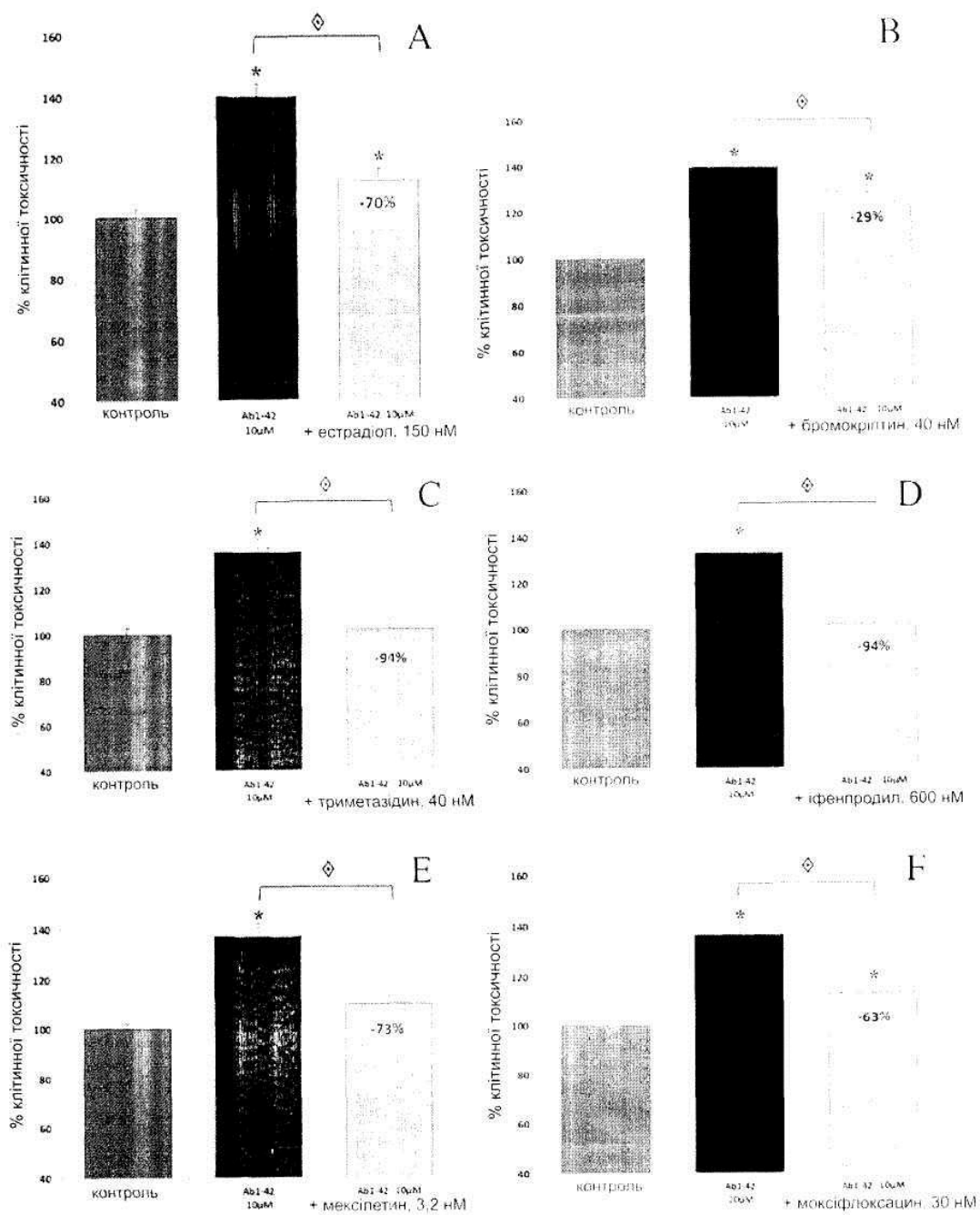
30

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

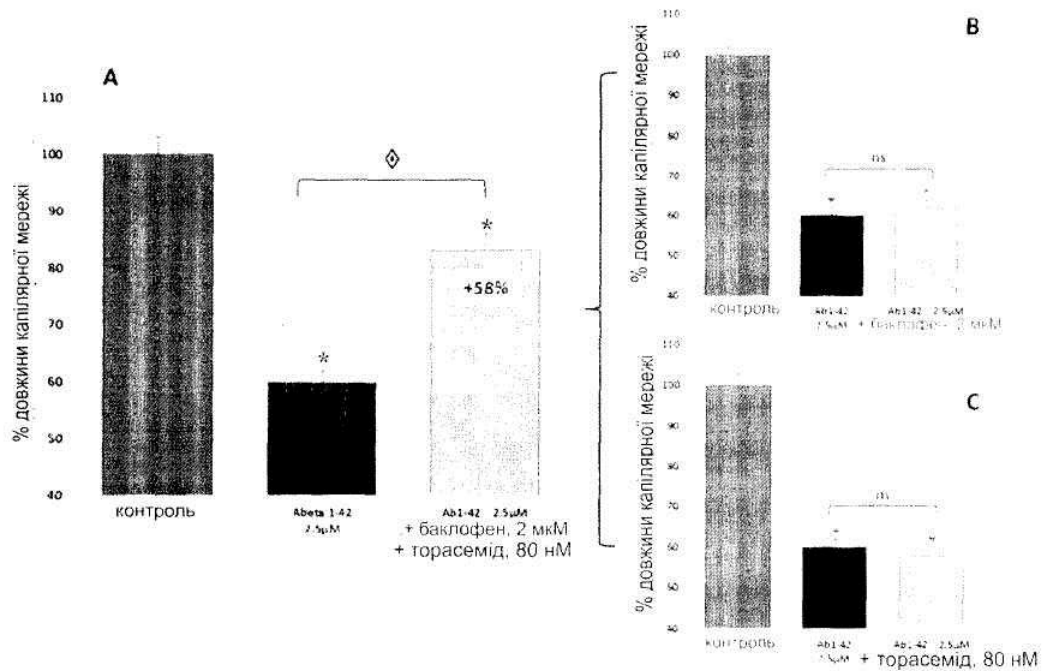
- 5 1. Комбінація, яка містить щонайменше торасемід і баклофен або їх солі, для регенерації нервів або нейронів у суб'єкта, що страждає від ушкодження нерва, вибраного з невротаксії, аксонотмезиса або невротмезиса, невропатії, викликаной прямим фізичним інсультом нерва або від хвороби Шарко-Марі-Тута .
- 10 2. Комбінація за п. 1, яка **відрізняється** тим, що включає щонайменше одну сполуку, вибрану з поміж сульфісоксазолу, метимазолу, прилокаїну, дифіліну, хінакрину, карбенексолону, акампросату, амінокапронової кислоти, баклофену, каберголіну, діетилкарбамазину, цинакальцету, цинаризину, еплеренону, фенолдопаму, лефлуноміду, левосимендану, сулодексиду, тербінафіну, зонісаміду, етомідату, фенформіну, триметазидину, мексилетину, іфенпродилу, моксифлоксацину або бромокріптину, або їх солей.
- 15 3. Комбінація за п. 2, яка **відрізняється** тим, що включає щонайменше одну з поміж наступних комбінацій сполук:
 - баклофен, триметазидин і торасемід,
 - баклофен, цинакальцет і торасемід,
 - баклофен, акампросат і торасемід,
 - 20 - баклофен, акампросат і торасемід і діетилкарбамазин, або
 - баклофен, акампросат і торасемід та іфенпродил.
4. Комбінація за будь-яким з попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що включає фармацевтично прийнятний носій або наповнювач.
5. Комбінація за будь-яким з попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що сполуки складені для введення разом, окремо або послідовно.
- 25 6. Комбінація за будь-яким з попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що сполуки вводять суб'єктові повторно.
7. Комбінація за будь-яким з попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що включає менше ніж 4 мг торасеміду.
- 30 8. Комбінація за будь-яким з попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що включає менше ніж 150 мг баклофену, бажано менше ніж 50 мг.
9. Спосіб стимуляції регенерації нерва або нейрона у суб'єкта, що страждає від ушкодження нерва, вибраного з невротаксії, аксонотмезиса, невротмезиса, невропатії, викликаной прямим фізичним інсультом нерва або від хвороби Шарко-Марі-Тута, який передбачає введення зазначеному суб'єктові торасеміду й баклофену або їх солей.
- 35 10. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що додатково передбачає введення фармацевтично прийнятного носія або наповнювача.
11. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що передбачає одночасне, окреме або послідовне введення суб'єктові торасеміду й баклофену.
- 40 12. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що передбачає введення менше ніж 4 мг торасеміду.
13. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що передбачає введення менше ніж 150 мг баклофену, бажано менше ніж 50 мг.



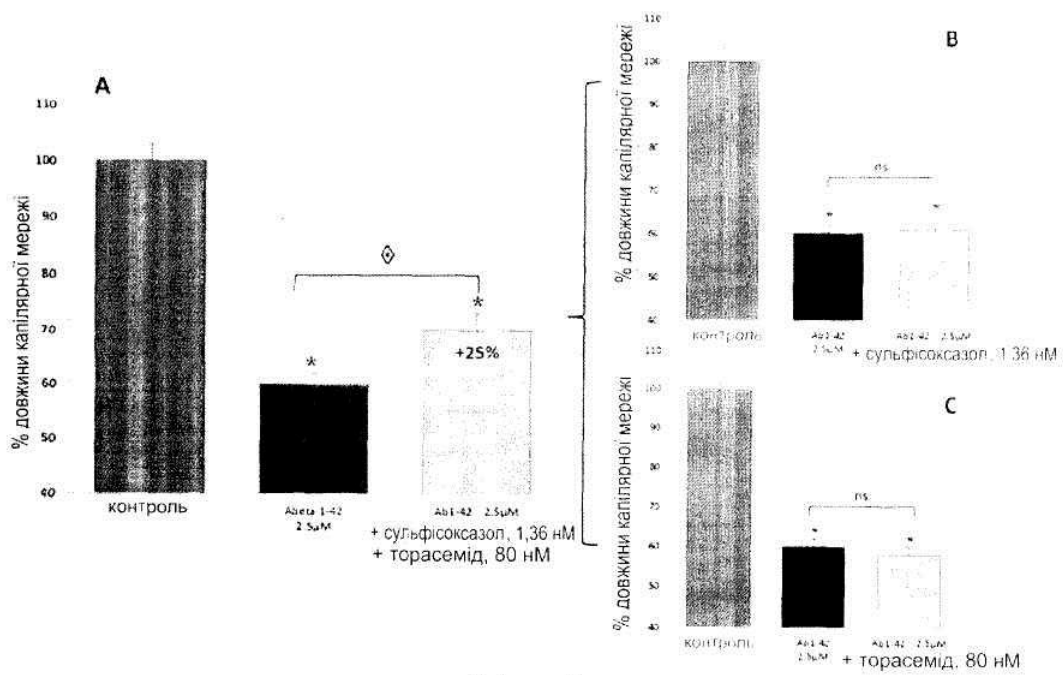
Фіг. 1



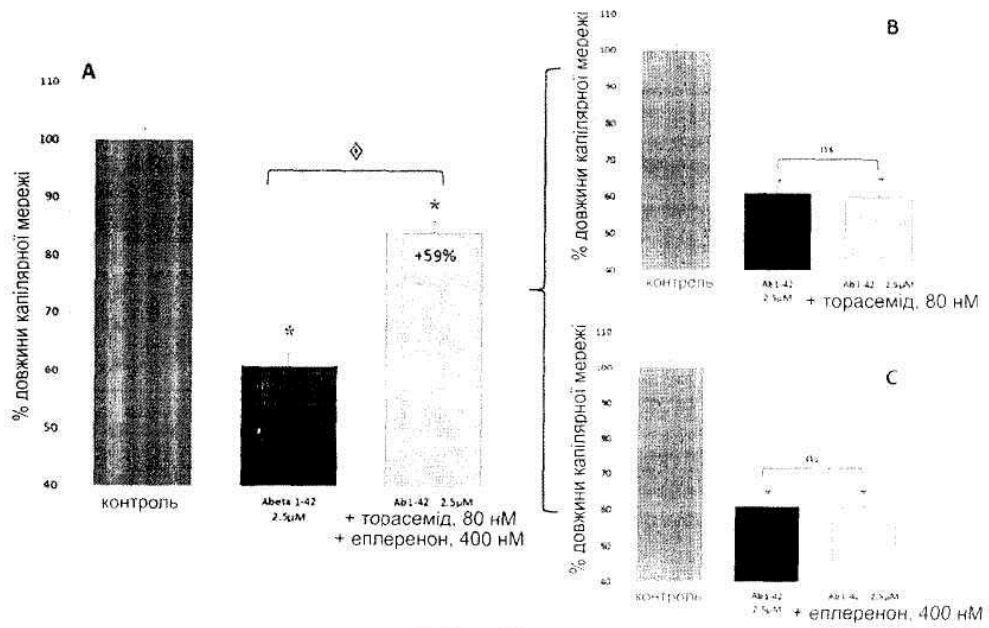
Фіг. 2



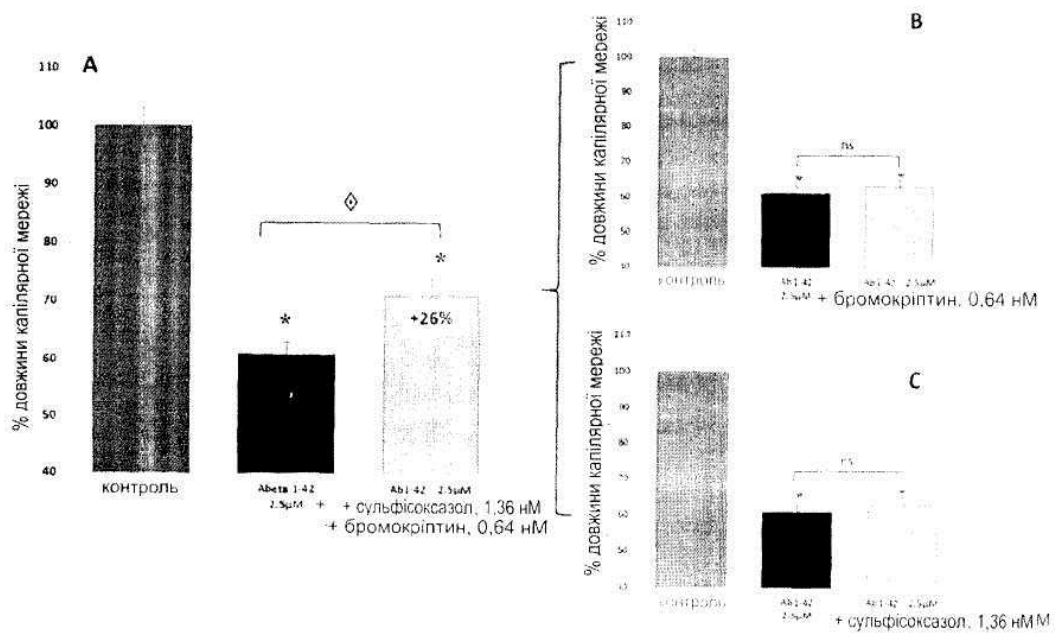
Фіг. 3



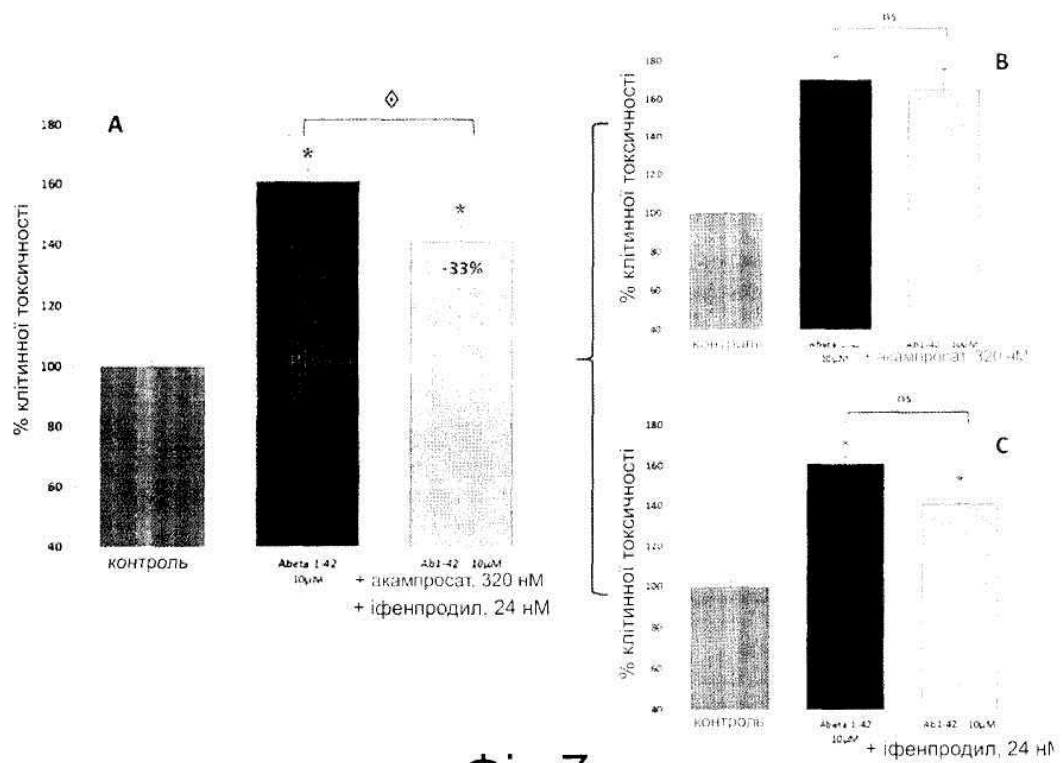
Фіг. 4



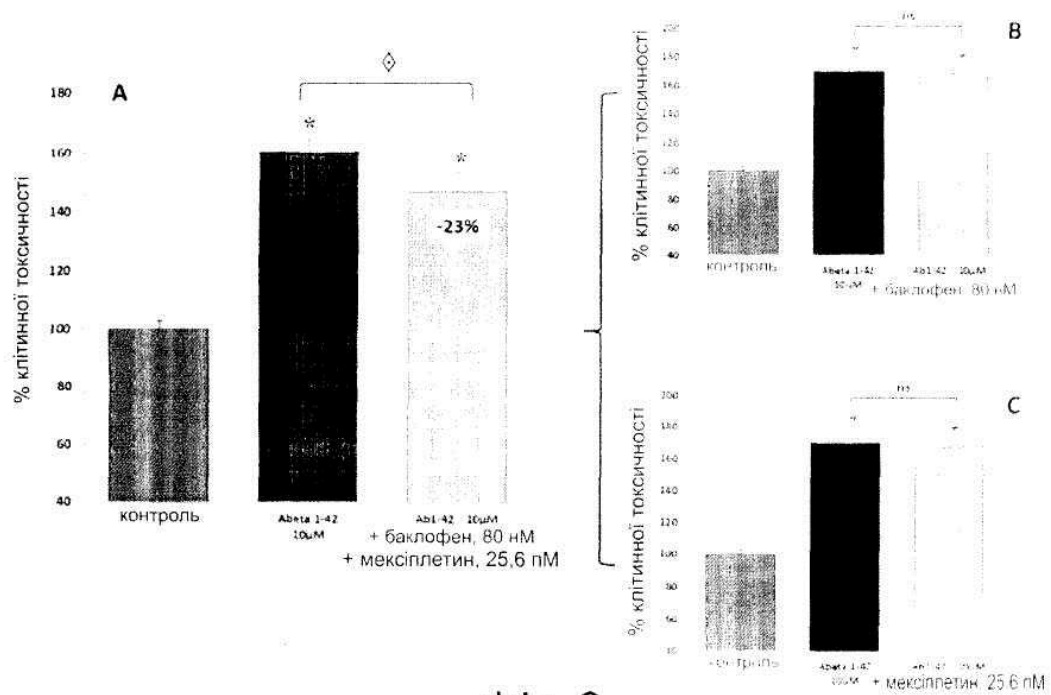
Фіг. 5



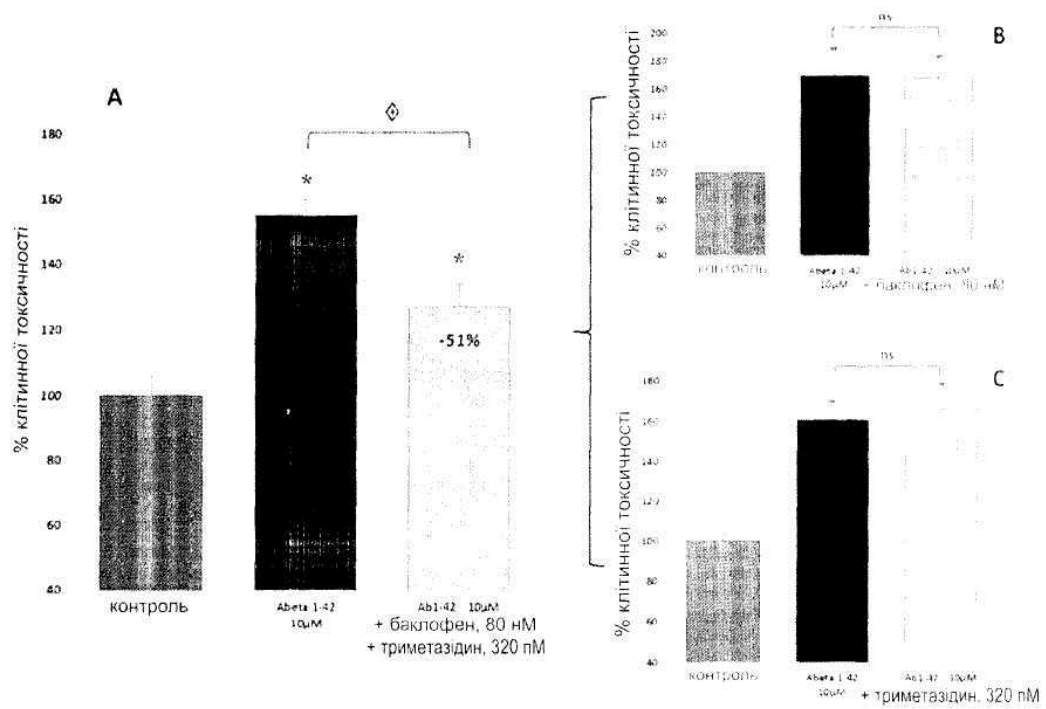
Фіг. 6



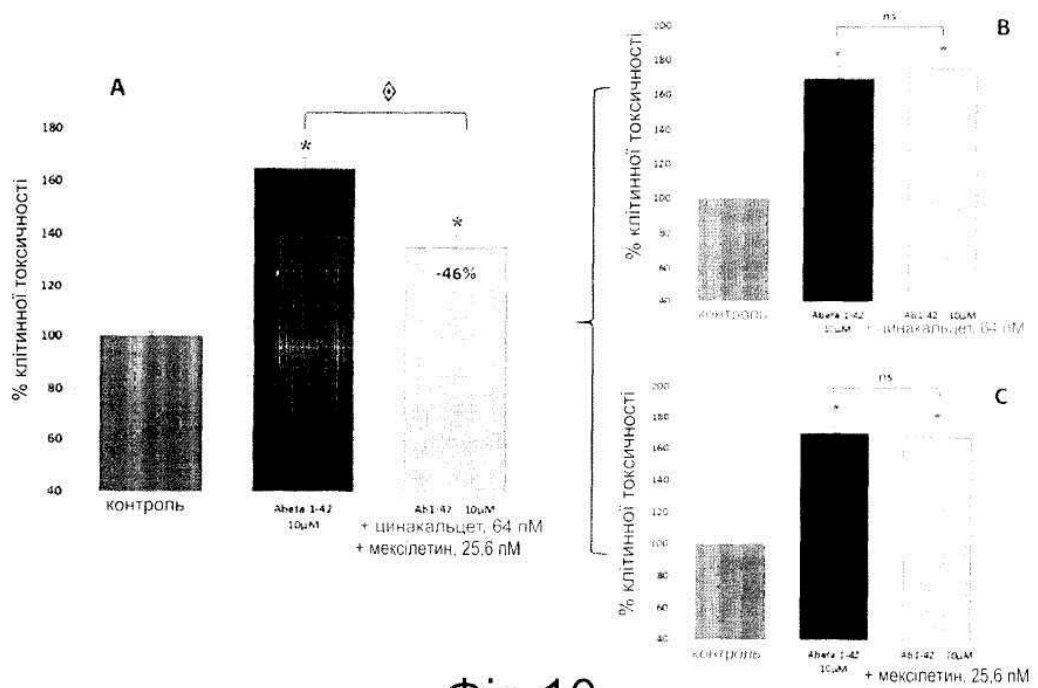
Фіг. 7



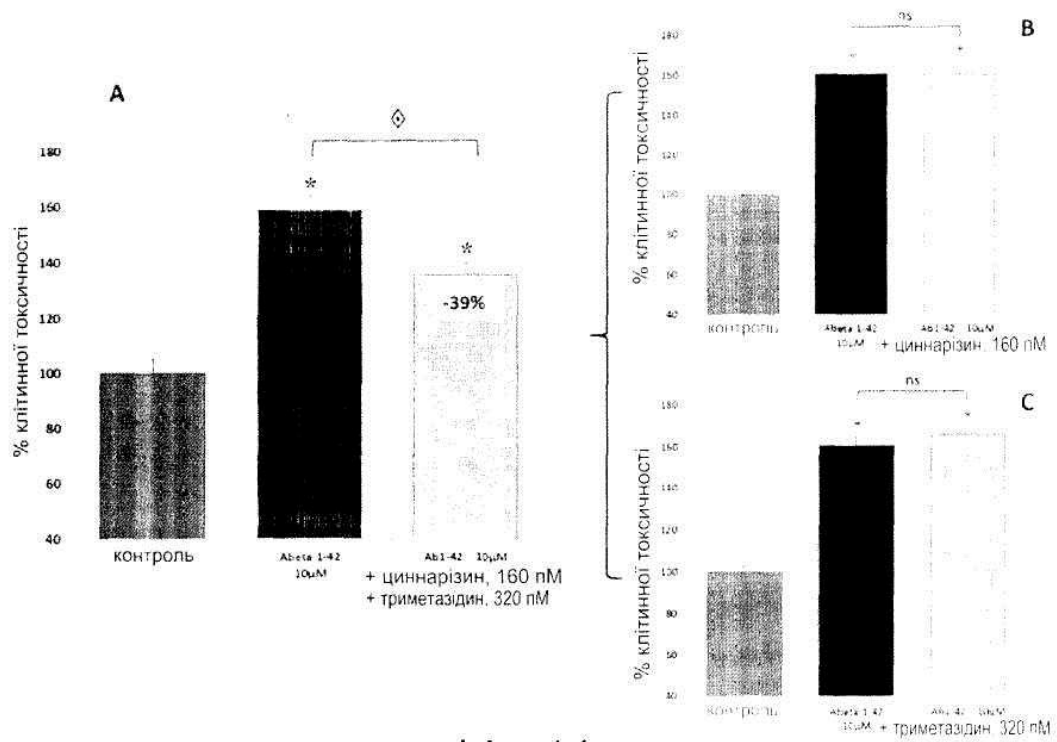
Фіг. 8



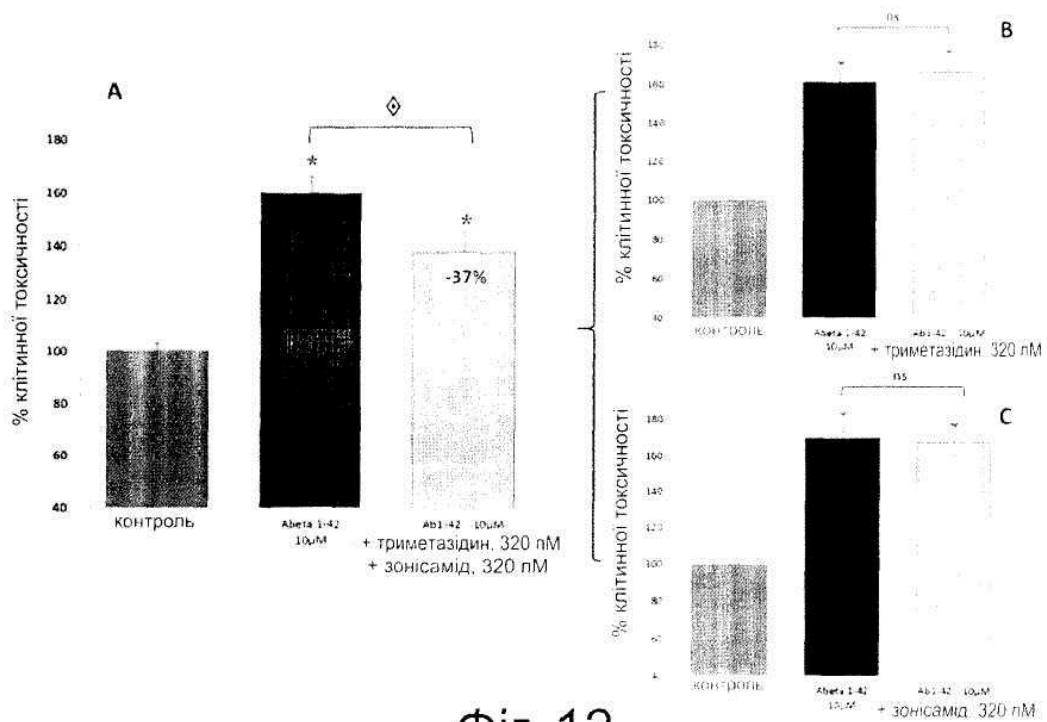
Фіг. 9



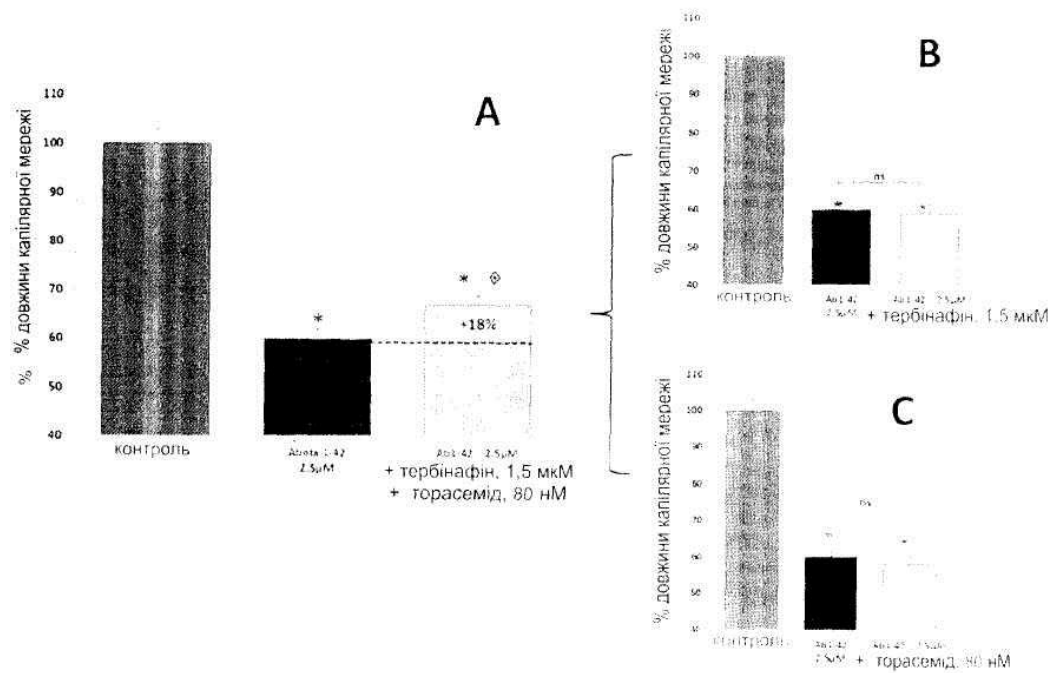
Фіг. 10



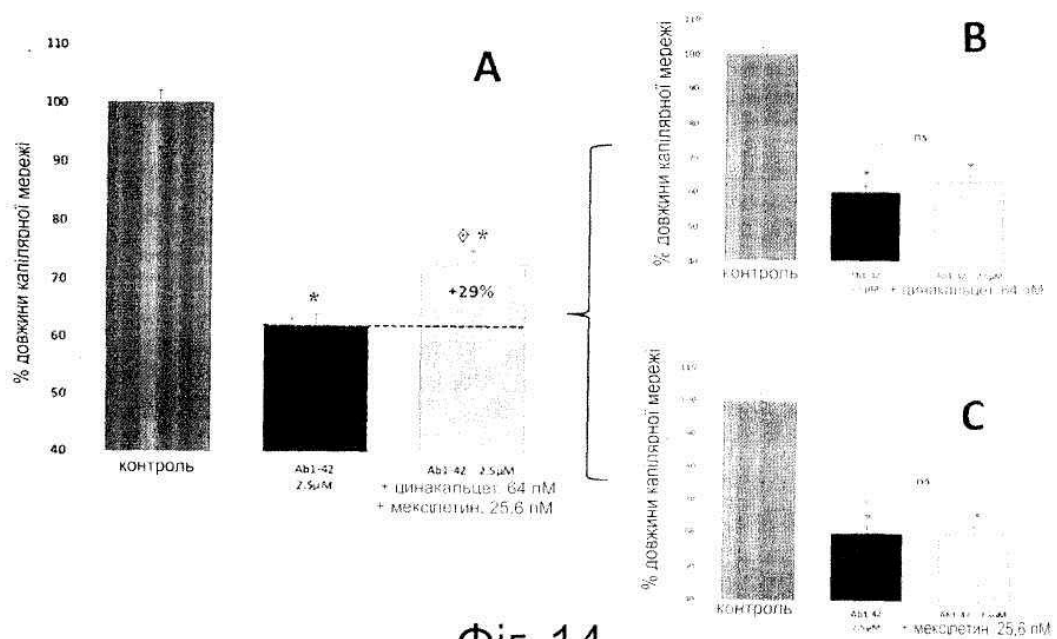
Фіг. 11



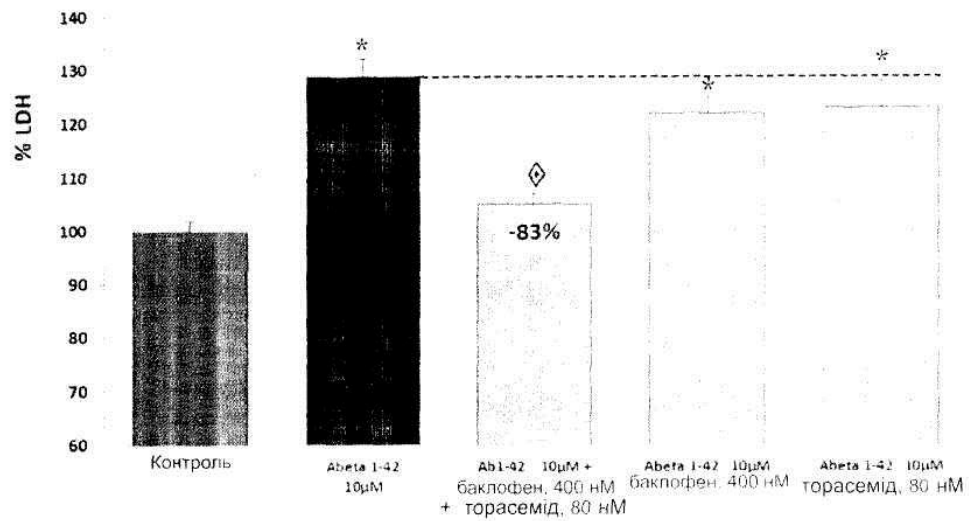
Фіг. 12



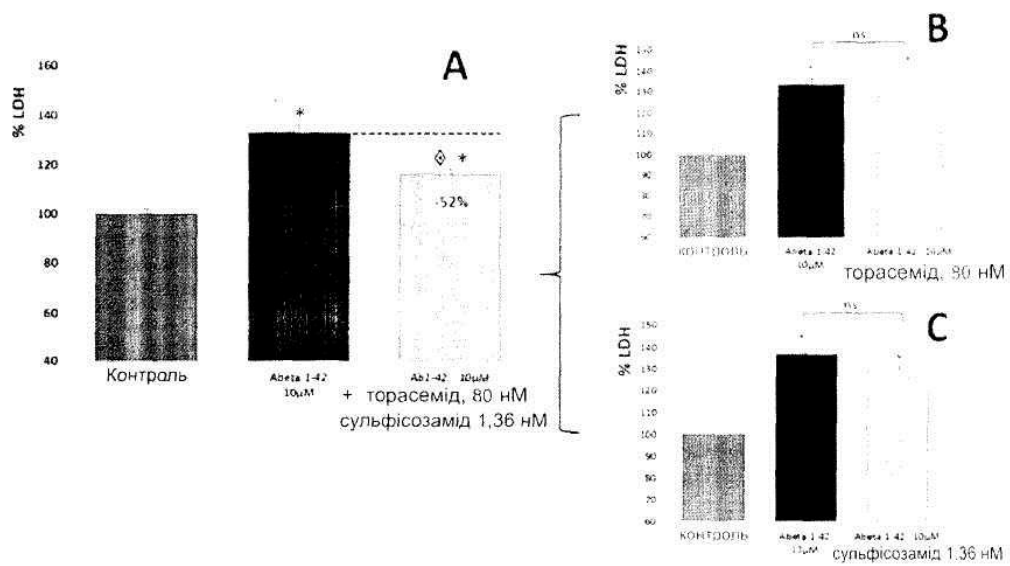
Фіг. 13



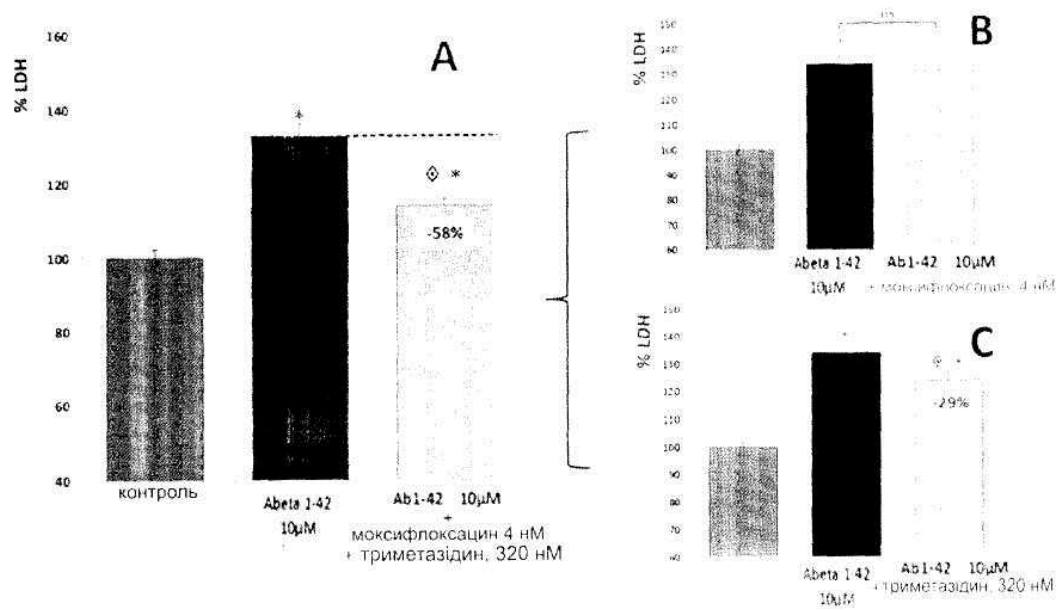
Фіг. 14



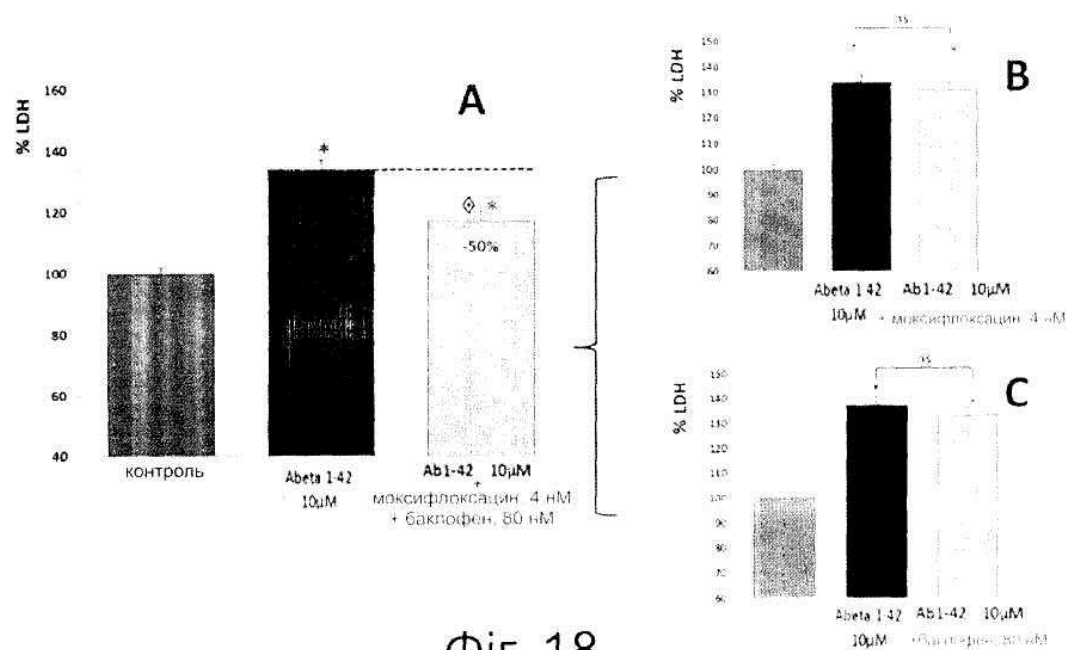
Фіг. 15



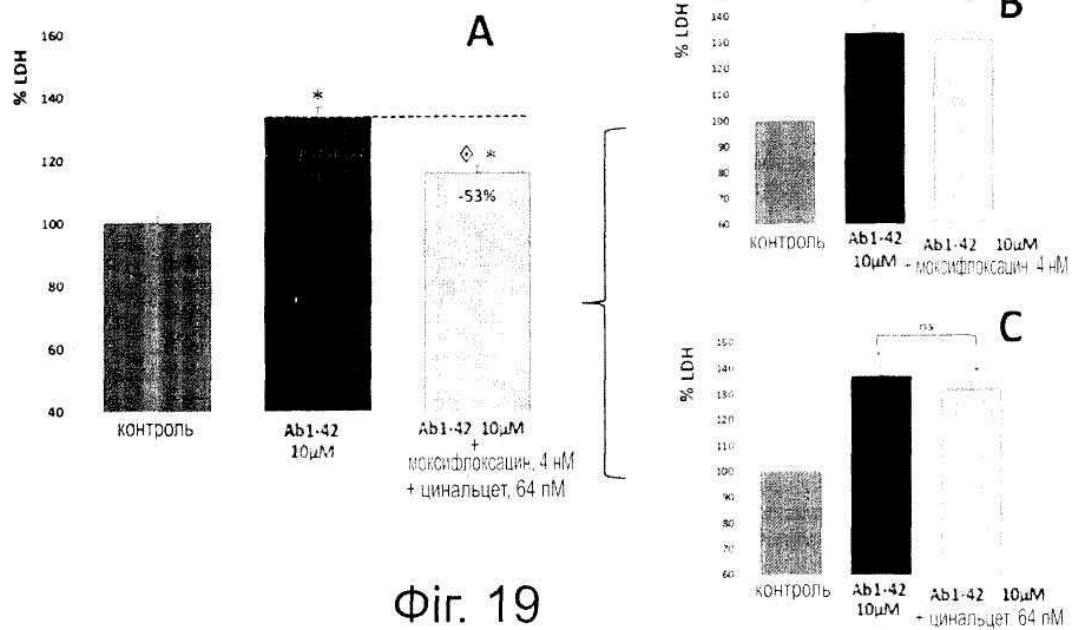
Фіг. 16



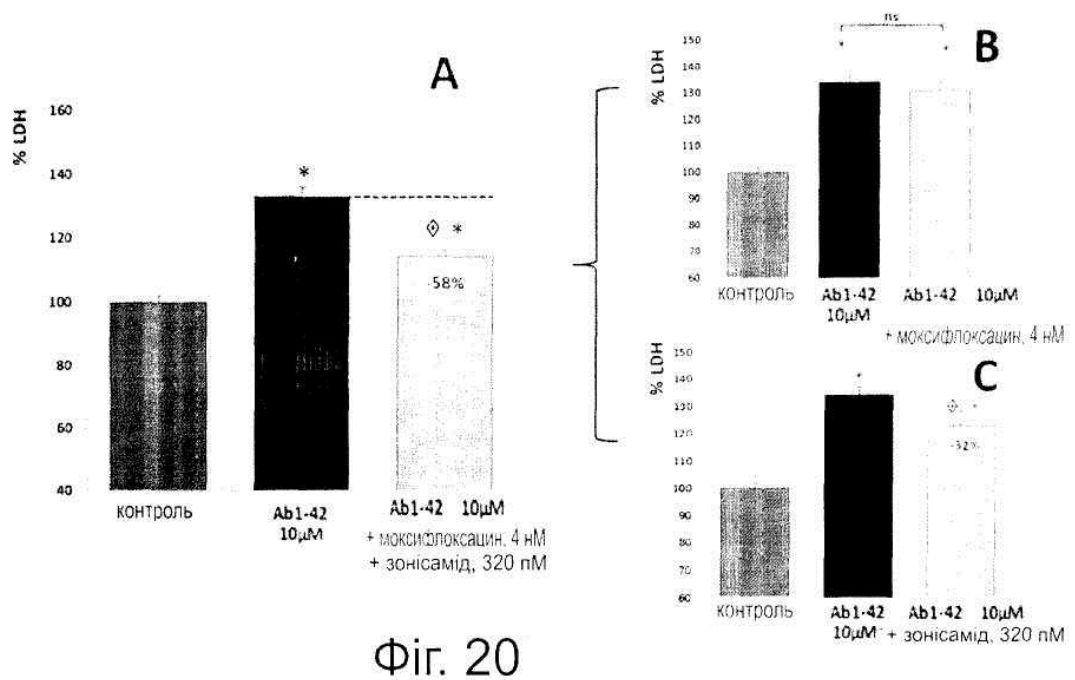
Фіг. 17



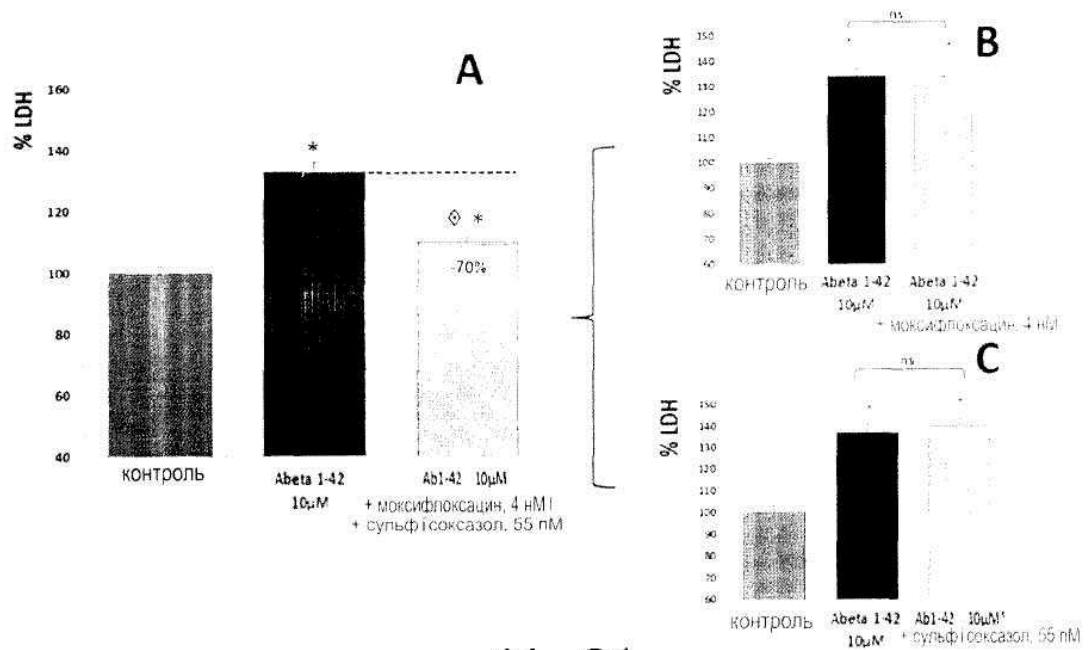
Фіг. 18



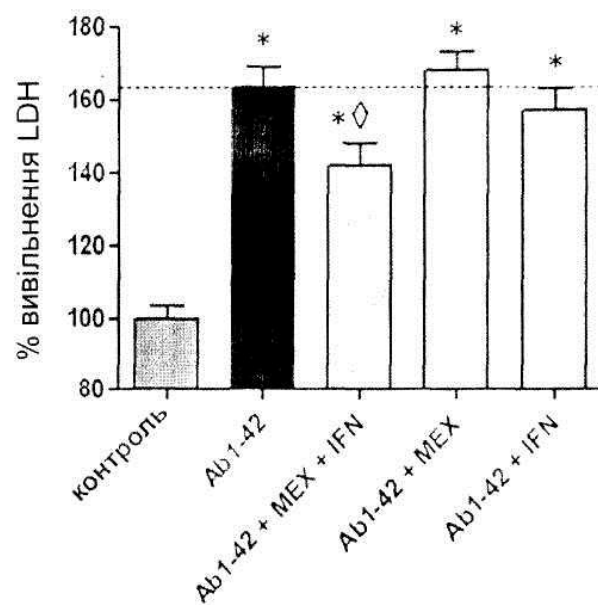
Фіг. 19



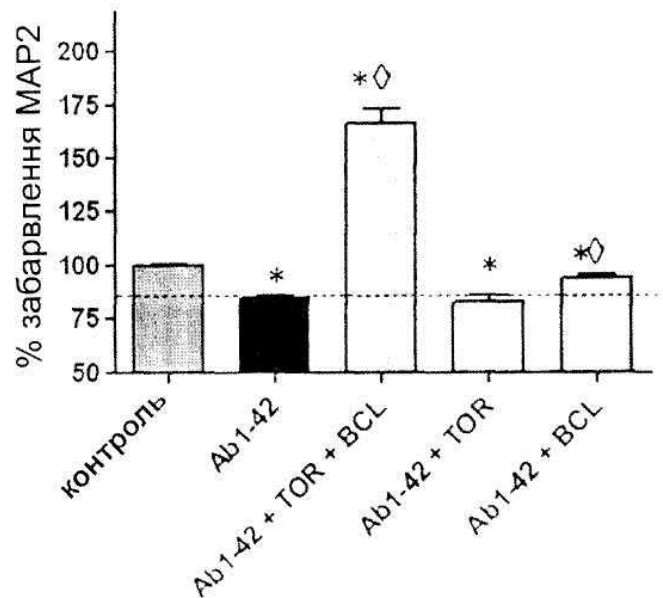
Фіг. 20



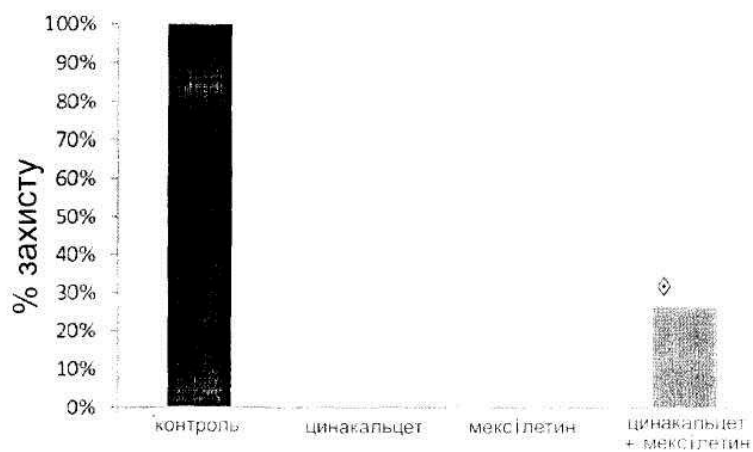
Фіг. 21



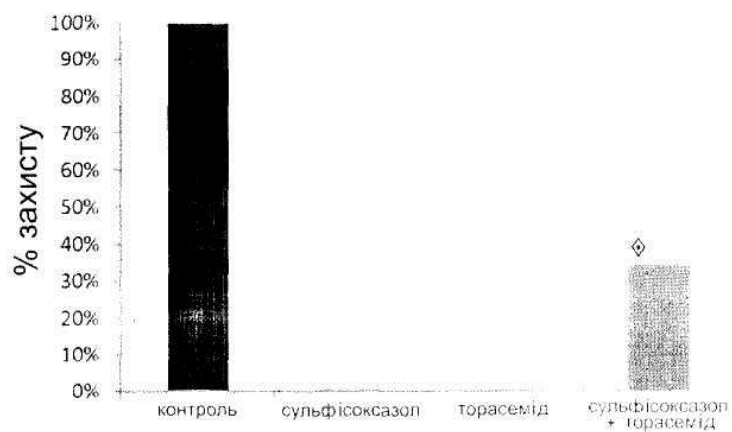
Фіг. 22



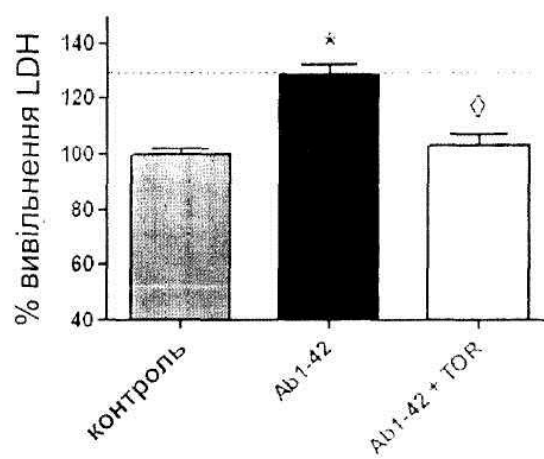
Фіг. 23



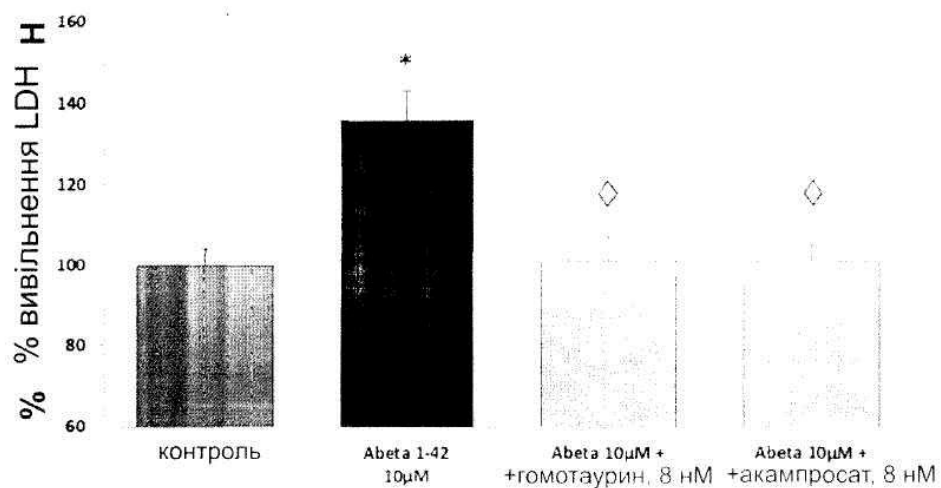
Фіг. 24



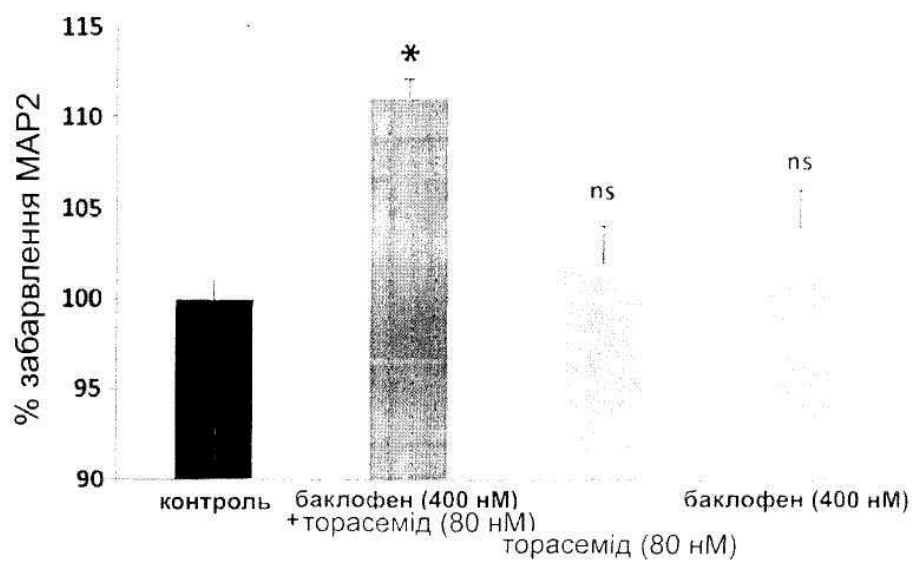
Фіг. 25



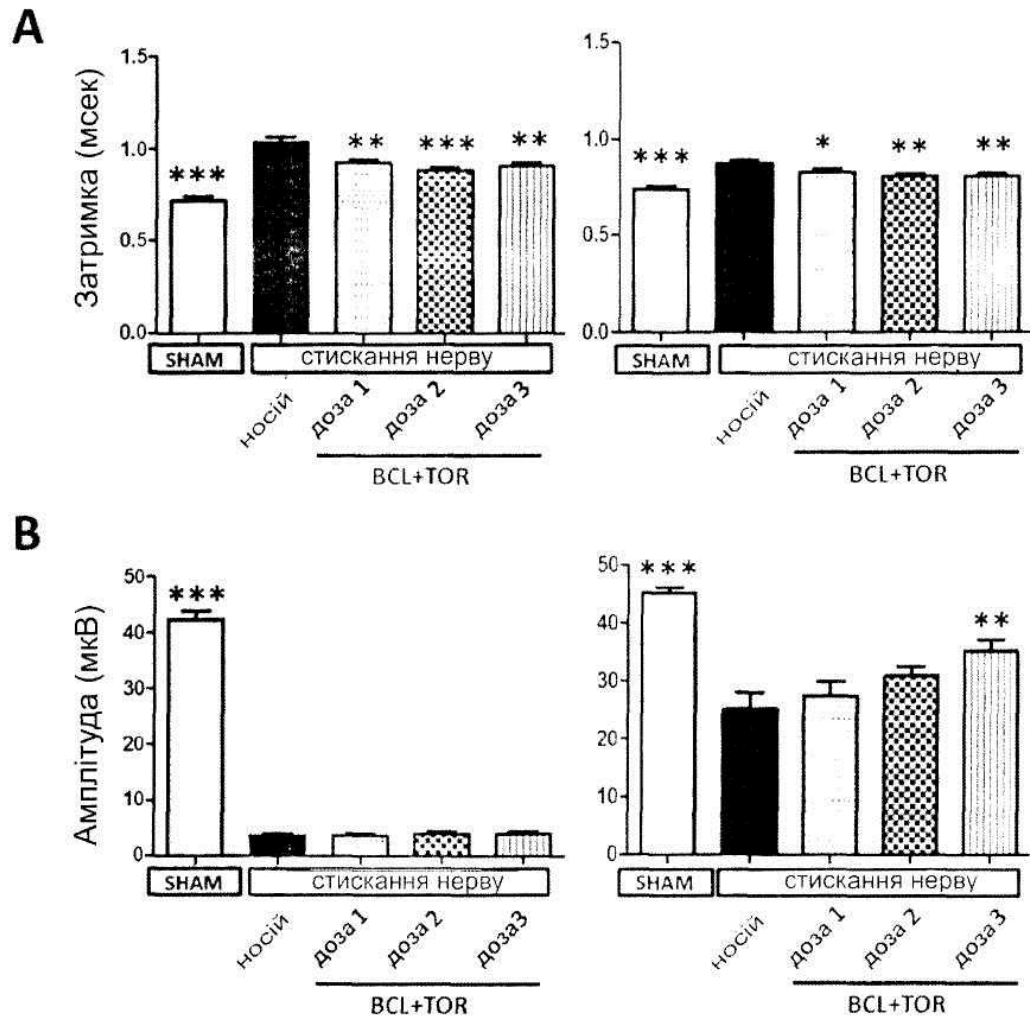
Фіг. 26



Фіг. 27



Фіг. 28



Фіг. 29

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601