

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034075**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2019.12.25**

**(21)** Номер заявки  
**201690501**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2014.09.01**

**(51)** Int. Cl. *A61K 31/195* (2006.01)  
*A61K 31/197* (2006.01)  
*A61K 31/44* (2006.01)  
*A61K 31/185* (2006.01)  
*A61P 25/00* (2006.01)  
*A61P 25/02* (2006.01)  
*A61P 25/28* (2006.01)

---

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ КОМБИНАЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ТОРАСЕМИД И БАКЛОФЕН, ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ НЕРВОВ ИЛИ НЕЙРОНОВ И СПОСОБ, ЕЕ ИСПОЛЬЗУЮЩИЙ**

---

**(31)** 14/014,650

**(32)** 2013.08.30

**(33)** US

**(43)** 2016.08.31

**(86)** PCT/EP2014/068494

**(87)** WO 2015/028659 2015.03.05

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ФАРНЕКСТ (FR)**

**(72)** Изобретатель:  
**Коэн Даниель, Чумаков Илья,  
Набирочкин Сергей, Гуэдж Микаэль,  
Вьяль Эмманюэль (FR)**

**(74)** Представитель:  
**Агуреев А.П., Фелицына С.Б. (RU)**

**(56)** WO-A2-2012117073

WO-A2-2012117075

US-A1-2012088744

CAMPBELL ET AL.: "Evaluation and management of peripheral nerve injury", CLINICAL NEUROPHYSIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE, IE, vol. 119, no. 9, September 2008 (2008-09), pages 1951-1965, XP023181516, ISSN: 1388-2457, DOI: 10.1016/J.CLINPH.2008.03.018 [retrieved on 2008-05-14], the whole document, abstract, page 1953, column 2, paragraph 3 - page 1954, column 1, paragraph 2, page 1958, column 1, paragraph 2 - page 1959, column 2, paragraph 1

FARONI ALESSANDRO ET AL.: "Baclofen Modulates the Expression and Release of Neurotrophins in Schwann-Like Adipose Stem Cells", JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE, HUMANA PRESS INC, NEW YORK, vol. 49, no. 2, 31 May 2012 (2012-05-31), pages 233-243, XP035164512, ISSN: 1559-1166, DOI: 10.1007/S12031-012-9813-6, abstract

MAGNAGHI VALERIO ET AL.: "GABAB receptors in Schwann cells influence proliferation and myelin protein expression", THE EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE MAY 2004, vol. 19, no. 10, May 2004 (2004-05), pages 2641-2649, XP055145918, ISSN: 0953-816X, abstract, page 2646, column 2, paragraph 2 - page 2648, column 1, paragraph 2, figures 6-7

---

**(57)** Изобретение относится к применению и способу усиления регенерации нервов или нейронов у субъекта, страдающего от повреждения нерва, выбранного из невротаксии, аксонотмезиса, невротмезиса, невропатии, вызванной прямым физическим инсультом нерва, или от болезни Шарко-Мари-Тута. Более конкретно, изобретение касается новой комбинаторной терапии, основанной на применении торасемида и баклофена или их солей.

---

**B1**

**034075**

**034075 B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым комбинированным терапиям для таких заболеваний, как болезнь Альцгеймера и родственные заболевания, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона, невропатии, алкоголизм, алкогольная абстиненция, болезнь Хантингтона и поражение спинного мозга. Более конкретно, настоящее изобретение относится к новым комбинаторным терапиям, основанным на применении торасемида и баклофена или их солей.

### Предшествующий уровень техники

Болезнь Альцгеймера (AD) является прототипной кортикальной деменцией, которая характеризуется дефицитом памяти вместе с дисфазией (расстройство речи, при котором имеет место ухудшение речи и понимание речи), диспраксией (неспособность к координации и осуществлению определенных преднамеренных движений и жестов в отсутствие моторной или сенсорной недостаточности) и агнозией (способность распознавать субъекты, людей, звуки, формы или запахи), обусловленными вовлечением областей кортикальной ассоциации (1-4).

AD в настоящее время является наиболее распространенной причиной деменции. Клинически характеризуется глобальным снижением когнитивной функции, которая медленно прогрессирует и оставляет пациентов в терминальной стадии прикованными к постели, страдающими недержанием и зависимыми от кустодальной помощи. Смерть наступает в среднем через 9 лет после установления диагноза (5).

Коэффициент заболеваемости AD драматически растет с возрастом. По оценкам демографических прогнозов Организации Объединенных Наций, количество людей старше 80 лет приблизится к 370 млн к 2050 году. По оценкам, в настоящее время 50% людей старше 85 лет страдают от AD. Следовательно, более чем 100 млн людей по всему миру будут страдать от деменции в 50-х годах. Огромное число людей, нуждающихся в постоянном уходе и других услугах, окажет серьезное влияние на медицинские, финансовые и человеческие ресурсы (6). Ухудшение памяти является ранним признаком заболевания и включает эпизодическую память (память для суточных-сегодняшних событий). Семантическая память (память для вербального и визуального смысла) при болезни затрагивается позднее. Патологические признаки AD включают амилоидные бляшки, содержащие бета-амилоид (Abeta), нейрофибриллярные клубки (NFT), содержащие Тау, и нейрональную и синаптическую дисфункцию и потерю (7-9). За последнее десятилетие были предложены две основные гипотезы о причине AD: "гипотеза амилоидного каскада", в которой утверждается, что нейродегенеративный процесс является сериями событий, вызванных аномальным процессингом белка-предшественника амилоида (APP) (10), и "гипотеза нейрональной цитоскелетной дегенерации" (11), которая предполагает, что изменения цитоскелета являются иницирующими событиями. Наиболее широко распространенной теорией, объясняющей прогрессию AD, остается гипотеза амилоидного каскада (12-14), а исследователи AD главным образом сфокусированы на определении механизмов, лежащих в основе токсичности, ассоциированной с белками Abeta. Микрососудистая проницаемость и ремоделирование, абберантный ангиогенез и гематоэнцефалический барьер были определены в качестве ключевых событий, способствующих токсичности APP в амилоидном каскаде (15). Напротив, белку Тау со стороны фармацевтической промышленности было уделено гораздо меньше внимания, чем амилоиду, из-за фундаментальных и практических проблем. Более того, изменение синаптической плотности является патологическим поражением, которое лучше коррелирует с когнитивными нарушениями, чем два других.

Исследования выявили, что амилоидная патология, по-видимому, прогрессирует нейротрансмиттер-специфичным образом, при этом холинергические окончания представляются наиболее уязвимыми, за ними следуют глутаматэргические окончания и, наконец, ГАМК-эргические окончания (9). Глутамат является наиболее распространенным возбуждающим нейромедиатором в нервной системе млекопитающих. В патологических состояниях его аномальное накопление в синаптической щели приводит к сверхактивации глутаматных рецепторов (16). Аномальное накопление глутамата в синаптической щели приводит к сверхактивации глутаматных рецепторов, результатом чего являются патологические процессы и, наконец, смерть нейрона. Этот процесс, названный эксайтотоксичностью, обычно наблюдается в тканях нейронов в ходе острых и хронических неврологических расстройств.

Становится очевидным, что эксайтотоксичность участвует в патогенезе нескольких заболеваний различной этиологии, таких как травмы спинного мозга, инсульт, черепно-мозговая травма, потеря слуха, алкоголизм и алкогольная абстиненция, алкогольная невропатия или невропатическая боль, а также нейродегенеративные заболевания, такие как рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона и болезнь Хантингтона (17-19). Разработка эффективного лечения этих заболеваний остается основной проблемой общественного здравоохранения из-за частоты их возникновения, а также из-за отсутствия лечебных процедур.

Антагонисты NMDAR, которые нацелены на различные участки данного рецептора, были протестированы для противостояния эксайтотоксичности. Неконкурентные антагонисты NMDAR нацелены на пору ионного канала, таким образом, снижая вход кальция в постсинаптические нейроны. Некоторые из них достигли статуса одобрения. Например, мамантин в настоящее время одобрен при болезни Альцгеймера от умеренной до тяжелой. Он клинически протестирован при других показаниях, которые включа-

ют компонент эксайтотоксичности, таких как алкогольная зависимость (фаза II), боковой амиотрофический склероз (фаза III), деменция, связанная с паркинсонизмом (фаза II), эпилепсия, болезнь Хантингтона (фаза IV), рассеянный склероз (фаза IV), болезнь Паркинсона (фаза IV) и черепно-мозговая травма (фаза IV). Данная молекула, однако, оказывает ограниченную пользу у большинства пациентов с болезнью Альцгеймера, потому что она оказывает умеренные симптоматические эффекты. Другой подход в ограничении эксайтотоксичности заключается в ингибировании пресинаптического высвобождения глутамата. Рилузол, в настоящее время утвержденный при боковом амиотрофическом склерозе, демонстрирует обнадеживающие результаты при ишемии и в моделях черепно-мозговой травмы (20-23). В настоящее время он протестирован в испытаниях фазы II для раннего рассеянного склероза, болезни Паркинсона (не демонстрирует лучшие результаты, чем плацебо), а также поражения спинного мозга. В 1995 году лекарственное средство достигло статуса орфанного препарата для лечения бокового амиотрофического склероза и в 1996 году - для лечения болезни Хантингтона.

WO 2009/133128, WO 2009/133141, WO 2009/133142 и WO 2011/054759 раскрывают молекулы, которые могут быть использованы в композициях для лечения неврологических расстройств.

Несмотря на активные исследования в данной области, существует потребность в альтернативных или улучшенных эффективных терапиях неврологических расстройств и, в частности, неврологических расстройств, связанных с токсичностью глутамата и/или амилоида бета. В изобретении предлагаются новые типы лечения таких неврологических расстройств центральной нервной системы (CNS) и периферической нервной системы (PNS).

### Сущность изобретения

Цель настоящего изобретения заключается в обеспечении новых терапевтических подходов для лечения неврологических расстройств.

Изобретение обуславливается, в частности, неожиданным обнаружением авторами того, что комбинации торасемида и баклофена или их солей представляют новые и эффективные терапии для лечения неврологических расстройств.

В изобретении, следовательно, предлагаются новые комбинации и способы для лечения неврологических расстройств, в частности AD, и связанных расстройств, рассеянного склероза (MS), бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Паркинсона (PD), нейропатии (например, невропатической боли или алкогольной невропатии), алкоголизма или алкогольной абстиненции, поражений периферической нервной системы, болезни Хантингтона (HD) и травмы спинного мозга.

В частности, изобретение относится к применению указанной комбинации для лечения неврологических расстройств, которая дополнительно содержит соединения, выбранные из сульфисоксазола, метимазола, прилокаина, дифиллина, хинакрин, карбенексолон, акампросата, аминокaproновой кислоты, баклофена, каберголина, диэтилкарбамазина, цинальцета, циннаризина, эплерона, фенолдопама, лефлуномида, левосимендана, сулодексида, терминафина, зонисамида, этомидата, феноформина, триметазидина, мексилетина, бромкриптина, ифенпродила, торасемида и моксифлоксацина или их солей.

Другим объектом настоящего изобретения является применение комбинации для лечения неврологического расстройства, которая включает, по меньшей мере, следующие соединения:

баклофен, триметазидин и торасемид,

баклофен, цинальцет и торасемид,

баклофен, акампросат и торасемид,

баклофен, акампросат и торасемид и диэтилкарбамазин или

баклофен, акампросат и торасемид и ифенпродил.

Комбинация по изобретению может дополнительно включать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

Применение по изобретению характеризуется тем, что соединения в указанной комбинации составлены в одной или отдельных композициях(ях) для введения вместе/совместно или последовательно.

Соединения в комбинации могут вводиться субъекту неоднократно.

Соединения в комбинации или их соли могут находиться в составе с замедленным высвобождением.

Предпочтительно комбинация включает менее чем 4 мг торасемида.

Предпочтительно комбинация включает менее чем 150 мг баклофена, предпочтительно менее чем 50 мг.

Другим объектом изобретения является способ стимуляции регенерации нерва или нейрона в субъекте, страдающем от повреждения нерва, выбранного из невротаксии, аксонотмезиса или невротмезиса, или невропатии, вызванной прямым физическим insultом нерва, или от болезни Шарко-Мари-Тута, включающий введение указанному субъекту торасемида и баклофена или их солей, составленных в одну или отдельные композицию(и).

Применяемая в способе композиция может содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

Способ по изобретению может включать одновременное, отдельное или последовательное введение торасемида и баклофена субъекту.

Соединения в композиции способа или их соли могут находиться в составе(ах) с замедленным вы-

свобождением.

Предпочтительно заявленный способ включает введение менее чем 4 мг торасемида.

Предпочтительно заявленный способ включает введение менее чем 150 мг баклофена, предпочтительно менее чем 50 мг.

Предпочтительные композиции лекарственных средств включают 3 или 4. Более того, вышеуказанные композиции лекарственных средств также могут быть использованы в дополнительной композиции с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами или обработками, оказывающими благоприятное воздействие на субъекты с неврологическим расстройством.

Изобретение может быть использовано на любом млекопитающем, особенно на субъекте-человеке, на любой стадии заболевания.

#### Краткое описание чертежей

Для фиг. 1-27, \*:  $p < 0,05$ , значимо отлично от контроля (без интоксикации); "ns": незначимый эффект (ANOVA + апостериорный критерий Даннета).

Фиг. 1. Влияние предварительной обработки выбранными лекарственными средствами на поражение НВМЕС человеческого  $A\beta_{1-42}$ .

(А) Проверка экспериментальной модели, используемой для скрининга лекарственных средств: 1 ч предварительная обработка VEGF при 10 нМ значимо защищает капиллярную сеть от данного амилоидного поражения (+70% капиллярной сети по сравнению с амилоидной интоксикацией). Интоксикация значимо предотвращается торасемидом (В) и бромкриптином (С) в дозах до 400 и 3,2 нМ соответственно, тогда как отсутствующий или слабый эффект отмечается для верхней и нижней доз.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , значимо отличается от амилоидной интоксикации.

Фиг. 2. Влияние предварительной обработки выбранными лекарственными средствами на высвобождение LDH в тестах токсичности  $A\beta_{1-42}$  на крысиных первичных кортикальных клетках.

(А) Проверка экспериментальной модели, используемой для скрининга лекарственных средств: 1 ч предварительная обработка эстрадиолом (150 нг/мл) значимо защищала нейроны от амилоидного поражения (-70%), которое рассматривается как положительный контроль для нейропротекции. Для всех экспериментов  $A\beta_{1-42}$  продуцирует значимую интоксикацию по сравнению с нейронами, обработанными носителем. Интоксикация значимо предотвращается бромкриптином (40 нМ, -29%) (В), триметазидином (40 нМ, -94%) (С), ифенпродилем (600 нМ, -94%) (D), мексилетином (3,2 нМ, -73%) (Е), моксифлоксацином (20 нМ, -63%) (F). Стоит отметить, что другие концентрации лекарственных средств, отсутствие или более слабое влияние отмечается для верхней или нижней доз.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , значимо отличается от интоксикации  $A\beta_{1-42}$ .

Фиг. 3. Влияние комбинации баклофена и торасемида на общую длину капиллярной сети в культурах НВМЕС, интоксигированных бета-амилоидом. Агрегированный человеческий амилоидный пептид ( $A\beta_{1-42}$  2,5 мкМ) дает значимую интоксикацию, выше 40%, по сравнению с клетками, обработанными носителем. Данная интоксикация значимо предотвращается комбинацией баклофена и торасемида (А), тогда как в этих концентрациях баклофен (В) и торасемид (С) отдельно не оказывают значимого воздействия на интоксикацию.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , значимо отличается от интоксикации  $A\beta_{1-42}$ .

Фиг. 4. Влияние комбинированной терапии сульфисоксазолом и торасемидом на общую длину капиллярной сети в культурах НВМЕС, интоксигированных бета-амилоидом. Агрегированный человеческий амилоидный пептид ( $A\beta_{1-42}$  2,5 мкМ) дает значимую интоксикацию, выше 40%, по сравнению с клетками, обработанными носителем. Данная интоксикация значимо предотвращается комбинацией сульфисоксазола и торасемида (А), тогда как в этих концентрациях сульфисоксазол (В) и торасемид (С) отдельно не оказывают значимого воздействия на интоксикацию.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , значимо отличается от интоксикации  $A\beta_{1-42}$ .

Фиг. 5. Влияние комбинированной терапии эплереноном и торасемидом на общую длину капиллярной сети в культурах НВМЕС, интоксигированных бета-амилоидом. Агрегированный человеческий амилоидный пептид ( $A\beta_{1-42}$  2,5 мкМ) дает значимую интоксикацию, выше 40%, по сравнению с клетками, обработанными носителем. Данная интоксикация значимо предотвращается комбинацией эплеренона и торасемида (А), тогда как в этих концентрациях торасемид (В) и эплеренон (С) отдельно не оказывают значимого воздействия на интоксикацию. \*:  $p < 0,05$ , значимо отличается от интоксикации  $A\beta_{1-42}$ .

Фиг. 6. Влияние комбинированной терапии бромкриптином и сульфисоксазолом на общую длину капиллярной сети в культурах НВМЕС, интоксигированных бета-амилоидом. Агрегированный человеческий амилоидный пептид  $A\beta_{1-42}$  2,5 мкМ) дает значимую интоксикацию, выше 40%, по сравнению с клетками, обработанными носителем. Данная интоксикация значимо предотвращается комбинацией бромкриптина и сульфисоксазола (А), тогда как в этих концентрациях бромкриптин (В) и сульфисоксазол (С) отдельно не оказывают значимого воздействия на интоксикацию.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , значимо отличается от интоксикации  $A\beta_{1-42}$ .

Фиг. 7. Влияние комбинированной терапии акампросатом и ифенпродилем на высвобождение LDH в тестах токсичности  $A\beta_{1-42}$  на крысиных первичных кортикальных клетках. Агрегированный человеческий амилоидный пептид ( $A\beta_{1-42}$  10 мкМ) дает значимую интоксикацию по сравнению с нейронами, обработанными носителем. Данная интоксикация значимо предотвращается комбинацией акампросата и



локсацина и триметазида (А). Добавление моксифлоксацина позволяет повысить на 100% эффект, наблюдаемый для триметазида (С) отдельно, тогда как в такой же концентрации моксифлоксацин (В) отдельно не оказывает значимого влияния на интоксикацию.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , значимо отличается от интоксикации  $A\beta_{1-42}$ .

Фиг. 18. Влияние комбинированной терапии моксифлоксацином и баклофеном на высвобождение LDH в тестах токсичности  $A\beta_{1-42}$  на крысиных первичных кортикальных клетках. Агрегированный человеческий амилоидный пептид ( $A\beta_{1-42}$  10 мкМ) дает значимую интоксикацию по сравнению с нейронами, обработанными носителем. Данная интоксикация значимо предотвращается комбинацией моксифлоксацина и баклофена (А), тогда как в этих концентрациях моксифлоксацин (В) и баклофен (С) отдельно не оказывают значимого воздействия на интоксикацию.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , значимо отличается от интоксикации  $A\beta_{1-42}$ .

Фиг. 19. Влияние комбинированной терапии моксифлоксацином и цинакальцетом на высвобождение LDH в тестах токсичности  $A\beta_{1-42}$  на крысиных первичных кортикальных клетках. Агрегированный человеческий амилоидный пептид ( $A\beta_{1-42}$  10 мкМ) дает значимую интоксикацию по сравнению с нейронами, обработанными носителем. Данная интоксикация значимо предотвращается комбинацией моксифлоксацина и цинакальцета (А), тогда как в этих концентрациях моксифлоксацин (В) и цинакальцет (С) отдельно не оказывают значимого воздействия на интоксикацию.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , значимо отличается от интоксикации  $A\beta_{1-42}$ .

Фиг. 20. Влияние комбинированной терапии моксифлоксацином и зонисамидом на высвобождение LDH в тестах токсичности  $A\beta_{1-42}$  на крысиных первичных кортикальных клетках. Агрегированный человеческий амилоидный пептид ( $A\beta_{1-42}$  10 мкМ) дает значимую интоксикацию по сравнению с нейронами, обработанными носителем. Данная интоксикация значимо предотвращается комбинацией моксифлоксацина и зонисамида (А). Добавление моксифлоксацина позволяет повысить на 81% эффект, наблюдаемый для зонисамида (С) отдельно, тогда как, в такой же концентрации, моксифлоксацин (В) отдельно не оказывает значимого влияния на интоксикацию.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , значимо отличается от интоксикации  $A\beta_{1-42}$ .

Фиг. 21. Влияние комбинированной терапии моксифлоксацином и сульфисоксазолом на высвобождение LDH в тестах токсичности  $A\beta_{1-42}$  на крысиных первичных кортикальных клетках. Агрегированный человеческий амилоидный пептид ( $A\beta_{1-42}$  10 мкМ) дает значимую интоксикацию по сравнению с нейронами, обработанными носителем. Данная интоксикация значимо предотвращается комбинацией моксифлоксацина и сульфисоксазола (А), тогда как в этих концентрациях моксифлоксацин (В) и сульфисоксазол (С) отдельно не оказывают значимого воздействия на интоксикацию.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , значимо отличается от интоксикации  $A\beta_{1-42}$ .

Фиг. 22. Влияние комбинированной терапии мексилетином (МЕХ) и ифенпродилом (IFN) на высвобождение LDH в тестах токсичности  $A\beta_{1-42}$  на крысиных первичных кортикальных клетках. Агрегированный человеческий амилоидный пептид ( $A\beta_{1-42}$  10 мкМ) дает значимую интоксикацию по сравнению с нейронами, обработанными носителем. Данная интоксикация значимо предотвращается комбинацией 25,6 пМ мексилетина и 24 нМ ифенпродила, тогда как в этих концентрациях мексилетин и ифенпродил отдельно не оказывают значимого воздействия на интоксикацию.  $\diamond$ :  $p < 0,0572$ , значимо отличается от интоксикации  $A\beta_{1-42}$ .

Фиг. 23. Влияние комбинации баклофена (BCL) и торасемида (TOR) на общую длину сети нейритов в кортикальных нейронах, интоксигированных бета-амилоидом. Человеческий амилоидный пептид ( $A\beta_{1-42}$  2,5 мкМ) продуцирует значимую интоксикацию, выше 15%, по сравнению с клетками, обработанными носителем. Данная интоксикация значимо предотвращается комбинацией баклофена и торасемида (А); более того данная комбинация позволяет усилить рост нейритов.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , значимо отличается от интоксикации  $A\beta_{1-42}$ .

Фиг. 24. Влияние комбинированной терапии цинакальцетом и мексилетином против токсичности глутамата на нейрональных кортикальных клетках. Интоксикация глутаматом значимо предотвращается комбинацией цинакальцета (64 пМ) и мексилетина (25,6 пМ), тогда как в этих концентрациях цинакальцет и мексилетин отдельно не оказывают значимого воздействия на интоксикацию.  $\diamond$ :  $p < 0,001$ , значимо отличается от интоксикации глутаматом; (ANOVA + постпостериорный критерий Даннетта).

Фиг. 25. Влияние комбинированной терапии сульфисоксазолом и торасемидом против токсичности глутамата на нейрональных кортикальных клетках. Интоксикация глутаматом значимо предотвращается комбинацией сульфисоксазола (64 пМ) и торасемида (25,6 пМ), тогда как в этих концентрациях сульфисоксазол и торасемид отдельно не оказывают значимого воздействия на интоксикацию.  $\diamond$ :  $p < 0,001$ , значимо отличается от интоксикации глутаматом; (ANOVA + постпостериорный критерий Даннетта).

Фиг. 26. Влияние предварительной обработки торасемидом (TOR) на высвобождение LDH в тестах токсичности  $A\beta_{1-42}$  на крысиных первичных кортикальных клетках.  $A\beta_{1-42}$  приводит к значимой интоксикации по сравнению с нейронами, обработанными носителем. Интоксикация значимо предотвращается торасемидом (200 нМ, -90%).  $\diamond$ :  $p < 0,0001$ : значимо отличается от интоксикации  $A\beta_{1-42}$ .

Фиг. 27. Влияние предварительной обработки акампросатом и его производным гомоаурином на высвобождение LDH в тестах токсичности  $A\beta_{1-42}$  на крысиных первичных кортикальных клетках.  $A\beta_{1-42}$  приводит к значимой интоксикации по сравнению с нейронами, обработанными носителем. Интоксика-

ция одинаково значимо предотвращается гомотаурином и акампросатом (99%, 8 нМ).  $\diamond$ :  $p < 0,0001$ : значимо отличается от интоксикации  $A\beta_{1-42}$ .

Фиг. 28. Влияние комбинации баклофена (BCL) и торасемида (TOR) на общую длину сети нейритов кортикальных нейронов, культивируемых в отсутствие токсичного вещества. Увеличение длины сети нейритов наблюдается, когда комбинация баклофена (400 нМ) и торасемида (80 нМ) добавляется в культуральную среду; более того, данная комбинация позволяет усилить рост нейритов, тогда как в этих концентрациях баклофен и торасемид отдельно не обладают значимым эффектом (ns) на длину сети нейритов. \*  $p < 0,005$ , значимо отличается от контроля.

Фиг. 29. Влияние комбинации баклофена (BCL) и торасемида (TOR) на стимуляцию регенерации нервов после раздавливания нерва.

(А) Животные, подвергнутые травме нерва (раздавливание нерва), обработанные комбинацией баклофена-торасемида, демонстрируют значимо более низкую задержку СМАР при стимуляции пораженного седалищного нерва на 7- и на 30 день с момента раздавливания нерва по сравнению с ложнооперированными животными (белый столбик) или животными, обработанными носителем.

(В) Амплитуды сигнала мышечных вызванных потенциалов при стимуляции седалищного нерва ниже у животных, подвергнутых поражению нерва по сравнению с ложнооперированными животными как на 7, так и на 30 день после сдавливания нерва. Значимое увеличение амплитуды СМАР наблюдается на 30 день после раздавливания нерва для животных, обработанных баклофеном (3 мг/кг) - торасемидом (400 мкг/кг) (доза 3). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ , значимо отличается от животных, обработанных носителем (черный столбик).

### Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предлагаются новые композиции и комбинации для лечения неврологических расстройств. Изобретение описывает новое применение лекарственных средств или новых комбинаций лекарственных средств, которые позволяют эффективно корректировать такие заболевания и могут быть использованы для лечения пациентов.

Изобретение подходит для лечения любого неврологического расстройства, будь то центральной или периферической системы, особенно расстройств, в которые вовлечена эксайтотоксичность амилоида и глутамата. Частные примеры таких расстройств включают нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера и родственные заболевания, рассеянный склероз (MS), боковой амиотрофический склероз (ALS), болезнь Паркинсона (PD), болезнь Хантингтона (HD) или другие неврологические расстройства, такие как невропатии (например, алкогольная невропатия или невропатическая боль), алкоголизм или алкогольная абстиненция и поражение спинного мозга. "Невропатии" относятся к состояниям, в которых нервы периферической нервной системы являются поврежденными, что включает повреждение периферической нервной системы, вызванные генетическими факторами, воспалительным заболеванием, повреждением химическим веществом, включая лекарственные средства (винкристин, оксалиплатин, этиловый спирт) или прямой физической инсульта нерва. Лечение невропатий также включает лечение невропатической боли.

Поражения периферической нервной системы можно классифицировать согласно стадии нейронального инсульта. Изобретение подходит для лечения нервных поражений в диапазоне от нейропраксии (состояние, при котором поражена только сигнальная способность нерва) до аксонотмезиса (поражение, предполагающее поражение аксонов, без повреждения окружающих соединительных тканей нервов), а также невротмезиса (поражение, повреждающее как аксон, так и окружающие ткани).

Изменения в аксоне или окружающих тканях (таких как миелин) могут быть генетического происхождения. Примером наследуемых невропатий является так называемое семейство заболеваний Шарко-Мари-Тута. Заболевания Шарко-Мари-Тута являются прогрессирующими расстройствами, которые влияют на периферические нервы, которые отличаются изменением специфического гена(ов). Мутация(и) приводит к поражению аксонов, которые передают нервные импульсы и/или влияют на продуцирование миелиновой оболочки шванновскими клетками, которые участвуют в скорости передачи нервного импульса. Они представлены несколькими типами (категоризированными по функции клинических признаков) и подтипами СМТ (соответствующих генетической классификации). Типами СМТ являются СМТ1, СМТ2, СМТ3, СМТ4, СМТ5, СМТ6, СМТDI, СМТRI, СМТX. Связанными периферическими невропатиями являются, например, HNPP (наследственная невропатия с подверженностью к параличу от сдавливания нерва), тяжелые демиелинизирующие невропатии (DSS, синдром Дежерин-Соттас), CHN (врожденная гипомиелинизирующая невропатия). На СМТ1 (демиелинизирующего типа) и СМТ2 (аксонального типа) приходится около 70% пациентов СМТ.

Изобретение особенно подходит для лечения AD и родственных расстройств. В контексте данного изобретения термин "расстройства, связанные с AD" включает сенильную деменцию типа AD (SDAT), деменцию телец Леви, сосудистую деменцию, легкое когнитивное нарушение (MCI) и возрастное ухудшение памяти (AAMI).

При использовании в этом документе "лечение" включает терапию, предотвращение, профилактику, замедление или уменьшение симптомов, провоцируемых или вызванных вышеуказанными заболеваниями или расстройствами. Термин "лечение" включает конкретный контроль прогрессии заболевания и

ассоциированных расстройств. Термин "обработка" особенно включает i) защиту против токсичности, вызванной амилоидом бета, или снижение или замедление указанной токсичности и/или ii) защиту против глутаматной эксайтотоксичности или снижение или замедление указанной токсичности у подвергнувшихся лечению субъектов. Термин "лечение" также обозначает улучшение когнитивного симптома или защиту нейрональных клеток. В отношении невропатий термин "лечение" также включает регенерацию нервов, которая охватывает ремиелинизацию, образование новых нейронов, глии, аксонов, миелина или синапсов.

В контексте изобретения обозначение специфических соединений предназначено для включения не только специфически обозначенных молекул, но также любой фармацевтически приемлемой соли, гидратов, производных (например, сложного эфира, простого эфира), изомеров, рацематов, конъюгатов или их пролекарств любой чистоты.

Термин "пролекарственное средство" при использовании в данном документе означает любое функциональное производное (или предшественник) соединения по настоящему изобретению, которое при введении в биологическую систему генерирует указанное соединение в результате, например, спонтанной химической(их) реакции(й), химической(их) реакции(й), катализируемой(ых) ферментом, и/или метаболической(их) химической(их) реакции(й). Пролекарственные средства, как правило, неактивны или менее активны, чем получающееся в результате лекарственное средство, и могут использоваться, например, для улучшения физико-химических свойств лекарственного средства, для направления лекарственного средства в конкретную ткань, для улучшения фармакокинетических и фармакодинамических свойств лекарственного средства и/или для уменьшения нежелательных побочных эффектов. Пролекарственные средства, как правило, имеют структуру X-лекарственного средства, где X представляет собой компонент инертного носителя и лекарственное средство представляет собой активное соединение, при этом пролекарство является менее активным, чем лекарственное средство, и лекарственное средство высвобождается из носителя *in vivo*. Некоторые из распространенных функциональных групп, которые часто включают при разработке пролекарственных средств, включают, в частности, карбоксильную, гидроксильную, аминогруппу, фосфат/фосфонат и карбонильную группу. Пролекарственные средства, которые, как правило, получают посредством модификации этих групп, включают, в частности, эфиры, карбонаты, карбаматы, амиды и фосфаты. Конкретное техническое руководство для выбора подходящих пролекарственных средств известно из области общих знаний (24-28). Кроме того, приготовление пролекарственных средств может быть осуществлено с помощью обычных способов, известных специалистам в данной области. Способы, которые могут использоваться для синтеза пролекарственных средств, описаны в многочисленных обзорах по данной теме (25; 29-35). Например, арбаклофен плакарбил приведен в базе данных ChemID plus Advance (website: [chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/](http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/)), и арбаклофен плакарбил представляет собой хорошо известное пролекарство баклофена (36; 43).

Термин "производное" соединения включает любую молекулу, которая функционально или структурно связана с указанным соединением, такую как кислота, амид, сложный эфир, простой эфир, ацетилированный вариант, гидроксिलированный вариант или алкилированный ( $C_1-C_6$ ) вариант такого соединения. Термин "производное" также включает структурно связанное соединение с потерей одного или нескольких заместителей, приведенных выше. Например, гомотаурин представляет собой деацетилированное производное акампросата. Предпочтительные производные соединения представляют собой молекулы, обладающие существенной степенью сходства с указанным соединением, как определено с помощью известных методов. Похожие соединения наряду с их индексом сходства с родительской молекулой могут быть обнаружены в многочисленных базах данных, таких как PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>) или DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>). В более предпочтительном воплощении производные должны обладать индексом сходства Танимото выше чем 0,4, предпочтительно выше чем 0,6, еще более предпочтительно выше чем 0,7, с родительским лекарственным средством. Индекс сходства Танимото широко используется для измерения структурного сходства между двумя молекулами. Индекс сходства Танимото может быть рассчитан с помощью программного обеспечения, такого как Small Molecule Subgraph Detector (37-38), доступного онлайн (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/SMSD/>). Предпочтительные производные должны быть родственны одновременно структурно и функционально с родительским соединением, т.е. они также должны сохранять по меньшей мере часть активности родительского лекарственного средства, более предпочтительно они должны иметь защитную активность против токсичности A $\beta$  и глутамата.

Термин "производные" также включает метаболиты лекарственного средства, например молекулу, которая получена в результате (биохимической) модификации(й) или процессинга указанного лекарственного средства после введения в организм, как правило, посредством специализированных ферментативных систем, и которые демонстрируют или сохраняют биологическую активность лекарственного средства. Метаболиты были раскрыты как ответственные за большую часть терапевтического действия родительского лекарственного средства. В конкретном воплощении "метаболит" при использовании в данном документе означает модифицированное или обработанное лекарственное средство, которое сохраняет по меньшей мере часть активности родительского лекарственного средства, предпочтительно которое обладает защитной активностью против токсичности A $\beta$  или глутамата. Примеры метаболитов

включают гидроксिलированные формы торасемида, являющиеся результатом метаболизма лекарственного средства в печени (Drug bank database (39)).

Термин "соль" относится к фармацевтически приемлемой и относительно нетоксичной неорганической или органической соли присоединения кислоты соединения по настоящему изобретению. Состав фармацевтической соли состоит из пары кислот, основной или цвиттерийной молекулы лекарственного средства с противоионом для создания соли лекарственного средства. Широкий спектр химических образцов может использоваться в реакции нейтрализации. Фармацевтически приемлемые соли по изобретению, таким образом, включают полученные с помощью реакции главного соединения, функционирующего в виде основания, с неорганической или органической кислотой с образованием соли, например солей уксусной кислоты, азотной кислоты, тартаровой кислоты, хлороводородной кислоты, серной кислоты, фосфорной кислоты, метансульфокислоты, камфорной сульфокислоты, щавелевой кислоты, малеиновой кислоты, янтарной кислоты или лимонной кислоты. Фармацевтически приемлемые соли по изобретению также включают те, в которых главное соединение функционирует как кислота и реагирует с подходящим основанием с образованием солей, например, натрия, калия, кальция, магния, аммония или холина. Хотя большинство из данных активных веществ являются биоэквивалентами, некоторые могут, среди прочего, обладать свойствами повышенной растворимости или биодоступности. Выбор соли представляет собой в данный момент стандартную операцию в процессе разработки лекарственного средства, что раскрыто Н. Stahl и С. G Wermuth в их руководстве (40).

Термин "комбинация" или "комбинированное лечение/терапия" означает лечение, при котором для вызова биологического эффекта субъекту совместно вводятся по меньшей мере два или больше лекарственных средства. В объединенной терапии согласно данному изобретению по меньшей мере два лекарственных средства могут вводиться вместе или отдельно, одновременно или последовательно. Также по меньшей мере два лекарственных средства могут быть введены различными путями и с помощью различных протоколов. Таким образом, хотя лекарственные средства комбинации могут быть объединены вместе, также они могут быть использованы по отдельности.

Как описано в примерах, торасемид, триметазидин, мексилетин, ифенпродил, бромкриптин и моксифлоксацин оказывают сильное неожиданное влияние на биологические процессы, вовлеченные в неврологические расстройства. Более того, эти соединения продемонстрировали *in vivo* очень эффективную способность для коррекции симптомов таких соединений. Эти молекулы, отдельно или в комбинированных терапиях, следовательно, представляют новые подходы для лечения неврологических расстройств, таких как болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, невропатий (например, невропатической боли или алкогольной невропатии), алкоголизма или алкогольной абстиненции или поражения спинного мозга. Комбинации этих лекарственных средств с другими выбранными соединениями (см. табл. 2) особенно выгодны тем, что они дают удивительный и неожиданный синергетический эффект в дозах, в которых лекарственные средства отдельно, по существу, не оказывают влияние. Также из-за их эффективности в данном документе описаны комбинации лекарственных средств, которые могут быть использованы при более низких дозировках, что является дополнительным очень существенным преимуществом.

В связи с этим в конкретном воплощении изобретение относится к композиции для применения при лечении AD, расстройств, связанных с AD, MS, PD, ALS, HD, невропатий (например, невропатической боли или алкогольной невропатии), алкоголизма или алкогольной абстиненции или поражения спинного мозга, включающей, по меньшей мере, торасемид, триметазидин, мексилетин, ифенпродил, бромкриптин или моксифлоксацин или их соли, пролекарства, производные или составы для замедленного высвобождения.

Конкретные номера CAS для каждого из этих соединений, предлагаются в табл. 1. В табл. 1 приведены также, в частности, стандартные соли, рацематы, пролекарственные средства, метаболиты или производные для этих соединений, используемых в композициях по изобретению.

Таблица 1

Лекарственное средство	Номера CAS	Класс или индекс сходства Танимото
Мексилетин и родственные соединения		
Мексилетин	31828-71-4; 5370-01-4	
6-Гидроксиметилмексилетин	53566-98-6	Метаболит
4-Гидроксимексилетин	53566-99-7	Метаболит
3-Гидроксимексилетин (МНМ)	129417-37-4	Метаболит
N-Гидроксимексилетин глюкуронид	151636-18-9	Метаболит
Сульфисоксазол и родственные соединения		
Сульфисоксазол	127-69-5; 4299-60-9	
N(4)-Ацетилсульфисоксазол	4206-74-0	Метаболит
Сульфисоксазол ацетил	80-74-0	Пролекарственное средство
Сульфаметоксазол	723-46-6	0.52
Цинакальцет и родственные соединения		
Цинакальцет	226256-56-0; 364782-34-3	
Гидрокориичная кислота	501-52-0	Метаболит
Торасемид и родственные соединения		
Торасемид	56211-40-6; 72810-59-4	
Гидрокситорасемид	99300-68-2; 99300-67-1	Метаболиты
Карбокситорасемид		Метаболит
Толбутамид	64-77-7	0.55
Бромокриптин и родственные соединения		
Бромокриптин	25614-03-3; 22260-51-1	
Ифенпродил и родственные соединения		
Ифенпродил	23210-56-2; 23210-58-4	

Указанные молекулы могут быть использованы сами по себе или предпочтительно в комбинированной терапии для обеспечения наиболее эффективной клинической пользы. В связи с этим в предпочтительном воплощении изобретение относится к композиции для применения при лечении неврологического расстройства, предпочтительно AD, родственного AD расстройства, MS, PD, ALS, HD, невропатий (например, невропатической боли или алкогольной невропатии), алкоголизма или алкогольной абстиненции или поражения спинного мозга, включающей любое одно из вышеуказанных соединений в комбинации по меньшей мере с одним другим соединением, выбранным из сульфисоксазола, метимазола, прилокаина, дифиллина, хинакрин, карбенексолон, акампросата, аминокaproновой кислоты, баклофена, каберголина, диэтилкарбамазина, цинакальцета, циннаризина, эплеренона, фенолдопама, лефлуномида, левосимендана, сулодексида, тербинафина, зонисамида, этомидата, феноформина, триметазида, мексилетина, ифенпродила, моксифлоксацина, бромокриптина или торасемида или их солей, пролекарства, производного или формы с замедленным высвобождением.

Конкретные номера CAS для каждого из этих дополнительных различных соединений, отличных от соединений табл. 1, представлены в табл. 2.

Таблица 2

Название лекарственного средства	Номер CAS
Акампросат	77337-76-9; 77337-73-6; 107-35-7; 3687-18-1
Аминокaproновая 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
Каберголин	81409-90-7
Карбенексолон	5697-56-3 или 7421-40-1
Циннаризин	298-57-7
Диэтилкарбамазин	90-89-1 или 1642-54-2
Дифиллин	479-18-5
Эплеренон	107724-20-9
Этомидат	33125-97-2
Фенолдопам	67227-57-0 или 67227-56-9
Лифлуномид	75706-12-6
Левосимендан	141505-33-1
Метимазол	60-56-0
Моксифлоксацин	151096-09-2 или 186826-86-8 или 192927-63-2 или 354812-41-2
Фенформин	114-86-3 или 834-28-6
Прилокаин	721-50-6 или 14289-31-7 или 14289-32-8
Квинакрин	83-89-6 или 69-05-6 или 6151-30-0
Сулодексид	57821-29-1
Тербинафин	91161-71-6
Триметазидин	5011-34-7 или 13171-25-0
Зонисамид	68291-97-4

Конкретные примеры пролекарственных средств баклофена представлены в Hanafi et al., 2011 (41), где продемонстрированы эфиры баклофена и эфир карбаминовой кислоты и баклофена в качестве особо интересных средств для направленного воздействия на ЦНС. Следовательно, такие пролекарственные средства особенно подходят для композиций по изобретению. Арбаклофен плакарбил, упомянутый ранее, также представляет собой хорошо известное пролекарственное средство и, таким образом, может использоваться вместо баклофена в композициях по изобретению. Другие пролекарственные средства баклофена могут быть обнаружены в следующих патентных заявках: WO 2010/102071, US 2009/197958, WO 2009/096985, WO 2009/061934, WO 2008/086492, US 2009/216037, WO 2005/066122, US 2011/021571, WO 2003/077902, WO 2010/120370.

Применяемые пролекарственные средства акампросата, такие как сложный эфир пантоевой кислоты и неопентилсульфонилловые эфиры, неопентилсульфонил эфирные пролекарственные средства или защищенные карбоксилатом неопентил сульфонил эфирные пролекарственные средства акампросата, приведены, в частности, в WO 2009/033069, WO 2009/033061, WO 2009/033054 WO 2009/052191, WO 2009/033079, US 2009/0099253, US 2009/0069419, US 2009/0082464, US 2009/0082440 и US 2009/0076147.

В предпочтительном воплощении изобретение относится к композиции, включающей по меньшей мере одно первое соединение, выбранное из торасемида, триметазидина, мексилетина, ифенпродила, бромкриптина и моксифлоксацина, соли(ей), пролекарства(в), производного(ых) любой химической чистоты или состава(ов) замедленного высвобождения, в комбинации по меньшей мере с одним вторым соединением, отличным от указанного первого соединения, выбранного из сульфисоксазола, метимазола, прилокаина, дифиллина, хинакрин, карбеноксолона, акампросата, аминокaproновой кислоты, баклофена, каберголина, диэтилкарбамазина, цинакальцета, циннаризина, эплерона, фенолдопама, лефлуномида, левосимендана, сулодексида, тербинафина, зонисамида, этомидата, фенформина, триметазидина, мексилетина, бромкриптина, ифенпродила, торасемида и моксифлоксацина, их соли(ей), пролекарства(в), производного(ых), любой химической чистоты, или состава(ов) с замедленным высвобождением для применения при лечении неврологического расстройства у нуждающегося в этом субъекта.

В конкретном воплощении изобретение относится к применению этих лекарственных средств или композиций для лечения AD и связанного расстройства у субъекта, нуждающегося в этом.

В конкретном применении изобретение относится к применению этих лекарственных средств или композиций для лечения >MS, PD, ALS, HD, невропатий (например, невропатической боли или алкогольной невропатии), алкоголизма или алкогольной абстиненции или поражения спинного мозга у нуждающегося в этом субъекта.

Как описано в примерах, комбинированные терапии с использованием одного или нескольких вышеперечисленных лекарственных средств приводят к эффективной коррекции болезни Альцгеймера и других неврологических заболеваний. Как проиллюстрировано в экспериментальном разделе, композиции, включающие, по меньшей мере, торасемид, триметазидин, мексилетин, ифенпродил, бромкриптин и моксифлоксацин, обеспечивают существенный терапевтический и биологический эффект для предотвращения токсических эффектов амилоидного (A $\beta$ ) белка или пептида на человеческие клетки. Более того, *in vivo* эти композиции приводят к улучшенным когнитивным симптомам, а также к ингибированию молекулярных путей, переключенных A $\beta$ -интоксикацией, в пределах эксайтотоксичности глутамата. Следовательно, они представляют новые и мощные способы лечения такого заболевания.

Экспериментальный раздел дополнительно демонстрирует, что вышеупомянутые композиции также являются эффективными i) при синергической защите *in vitro* нейрональных клеток от токсичности глутамата и ii) в придании клинической пользы в *in vivo* моделях для заболеваний, связанных с эксайтотоксичностью глутамата.

Более предпочтительно композиции лекарственных средств изобретения могут включать 1, 2, 3, 4 или 5 различных лекарственных средств, еще более предпочтительно 2, 3 или 4 различных лекарственных средства для комбинированного лечения болезни Альцгеймера, связанных с AD расстройств, MS, PD, ALS, HD, невропатий (например, невропатической боли или алкогольной невропатии), алкоголизма или алкогольной абстиненции или поражения спинного мозга у субъекта, нуждающегося в этом. В предпочтительном воплощении лекарственные средства изобретения используются в комбинации(ях) для объединенного, раздельного или последовательного введения в целях предотвращения наиболее эффективного воздействия.

В конкретном воплощении композиция включает (i) торасемид и (ii) соединение, выбранное из бромкриптина, баклофена, сульфисоксазола, эплерона или тербинафина, или соли, пролекарства, производного, или состава для замедленного высвобождения указанных соединений (i) и (ii).

В другом конкретном воплощении композиция включает (i) триметазидин и (ii) соединение, выбранное из баклофена, циннаризина, зонисамида или моксифлоксацина или соли, пролекарственного средства, производного или состава для замедленного высвобождения указанных соединений (i) и (ii).

Согласно дополнительному конкретному высвобождению, композиция включает (i) моксифлоксацин и (ii) соединение, выбранное из баклофена, цинакальцета, зонисамида, сульфисоксазола или триметазидина или соли, пролекарства, производного или состава для замедленного высвобождения указанных

соединений (i) и (ii).

В другом дополнительном конкретном воплощении, композиция включает (i) мексилетин и (ii) соединение, выбранное из баклофена, цинакальцета, ифенпродила или левосимендана или соли, пролекарства, производного или состава замедленного высвобождения указанных соединений (i) и (ii).

Конкретное воплощение также относится к композиции, включающий (i) ифенпродил и (ii) соединение, выбранное из акампросата, левосимендана или мексилетина или соли, пролекарства, производного или состава замедленного высвобождения указанных соединений (i) и (ii).

Предпочтительные соединения изобретения для применения при лечении неврологического расстройства, такого как болезнь Альцгеймера (AD), связанные с AD расстройства, MS, PD, ALS, HD, невропатии (например, невропатическая боль или алкогольная невропатия), алкоголизм или алкогольная абстиненция или поражение спинного мозга, включают одну из следующих комбинаций лекарственного средства, для объединенного, отдельного или последовательного введения:

Баклофен и Торасемид,  
 Эплеренон и Торасемид,  
 Акампросат и Ифенпродил,  
 Баклофен и Мексилетин,  
 Баклофен и Триметазидин,  
 Бромкриптин и Сульфисоксазол,  
 Цинакальцет и Мексилетин,  
 Циннаризин и Триметазидин,  
 Сульфисоксазол и Торасемид,  
 Триметазидин и Зонисамид,  
 Левосимендан и Мексилетин,  
 Левосимендан и Ифенпродил,  
 Левосимендан и Триметазидин,  
 Левосимендан и Моксифлоксацин,  
 Тербинафин и Торасемид,  
 Моксифлоксацин и Триметазидин,  
 Моксифлоксацин и Баклофен,  
 Моксифлоксацин и Цинакальцет,  
 Моксифлоксацин и Зонисамид,  
 Моксифлоксацин и Сульфисоксазол или  
 Мексилетин и Ифенпродил.

Примеры предпочтительных композиций по изобретению, включающие комбинацию по меньшей мере трех соединений, для комбинированного, отдельного или отдельного введения предлагаются ниже:

Баклофен и Триметазидин и Торасемид,  
 Баклофен и Цинакальцет и Торасемид,  
 Баклофен и Акампросат и Торасемид,  
 Левосимендан и Баклофен и Триметазидин,  
 Левосимендан и Аминокапроевая кислота и Триметазидин,  
 Левосимендан и Тербинафин и Триметазидин или  
 Левосимендан и Сульфисоксазол и Триметазидин.

Примеры предпочтительных композиций по изобретению, включающие комбинацию по меньшей мере четырех соединений, для комбинированного, отдельного или отдельного введения предлагаются ниже:

Сульфисоксазол и Триметазидин и Торасемид и Зонисамид,  
 Сульфисоксазол и Мексилетин и Торасемид и Цинакальцет,  
 Баклофен и Акампросат и Торасемид и Диэтилкарбамазин или  
 Баклофен и Акампросат и Торасемид и Ифенпродил.

Как описано в экспериментальном разделе, вышеуказанные комбинированные терапии изобретения индуцируют сильный нейропротективный эффект против токсичности A $\beta$  и оказывают положительные воздействия на поведенческие эффективности и биохимические тесты *in vivo*. Результаты демонстрируют, что композиции изобретения i) эффективно корректируют молекулярные пути, переключенные, *in vivo*, агрегатами A $\beta$  и ii) приводят к улучшению нейрофизиологических поражений, наблюдаемых у пораженных животных в виде нейронального выживания или синаптической целостности.

Более того, представленные результаты также демонстрируют, что вышеуказанные комбинированные терапии обладают важным синергическим нейропротективным эффектом против глутаматной эксайтотоксичности (фиг. 24 и 25, табл. 8), путь которой вовлечен в различные неврологические заболевания, такие как AD, MS, PD, ALS, HD, невропатии (например, невропатическая боль или алкогольная невропатия), алкоголизм или алкогольная абстиненция или поражение спинного мозга. Эти терапии дают положительные результаты в *in vivo* или *in vitro* моделях для этих заболеваний.

Кроме того, результаты *in vivo* также демонстрируют, что композиции изобретения эффективно восстанавливают целостность гематоэнцефалического барьера, который, как известно, поражается некоторыми неврологическими заболеваниями.

Субъект изобретения, таким образом, также заключается в композиции, определенной выше, для лечения неврологического расстройства, такого как болезнь Альцгеймера (AD), связанные с AD расстройства, MS, PD, ALS, HD, невропатии (например, невропатическая боль или алкогольная невропатия), алкоголизм или алкогольная абстиненция или поражение спинного мозга.

Другой субъект изобретения заключается в применении композиции, определенной выше, для лечения неврологического расстройства, такого как болезнь Альцгеймера (AD), связанные с AD расстройства, MS, PD, ALS, HD, невропатии (например, невропатическая боль или алкогольная невропатия), алкоголизм или алкогольная абстиненция или поражение спинного мозга.

В изобретении также предлагается способ для лечения неврологического расстройства, такого как болезнь Альцгеймера (AD), связанные с AD расстройства, MS, PD, ALS, HD, невропатии (например, невропатическая боль или алкогольная невропатия), алкоголизм или алкогольная абстиненция или поражение спинного мозга, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества композиции, описанной выше.

Как указано ранее, соединения в комбинированном лечении или композиции настоящего изобретения могут быть составлены вместе или отдельно и введены вместе, отдельно или последовательно и/или циклически.

В связи с этим конкретная задача изобретения заключается в способе лечения AD, связанного с AD расстройства, MS, PD, ALS, HD, невропатий (например, невропатической боли или алкогольной невропатии), алкоголизма или алкогольной абстиненции или поражения спинного мозга, включающем введение одновременно, отдельно или последовательно субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества композиции, описанной выше.

В предпочтительном воплощении изобретение относится к способу лечения болезни Альцгеймера (AD), связанного с AD расстройства, MS, PD, ALS, HD, невропатий (например, невропатической боли или алкогольной невропатии), алкоголизма или алкогольной абстиненции или поражения спинного мозга, у субъекта, нуждающегося в этом, включающего, по меньшей мере, торасемид, триметазидин, мексилетин, ифенпродил, бромкриптин или моксифлоксацин, или их соли(ей), пролекарства(в), производного(ых) или состава(ов) для замедленного высвобождения, предпочтительно в комбинации, с описанными выше.

В другом воплощении данное изобретение относится к способу лечения болезни Альцгеймера (AD), расстройства, связанного с AD, MS, PD, ALS, HD, невропатий (например, невропатической боли или алкогольной невропатии), алкоголизма или алкогольной абстиненции или поражения спинного мозга у нуждающегося в этом субъекта, включающему одновременное, отдельное или последовательное введение субъекту по меньшей мере одного первого соединения, выбранного из группы, включающей торасемид, триметазидин, мексилетин, ифенпродил, бромкриптин и моксифлоксацин, их соли, пролекарства, производные или любые составы, в комбинации по меньшей мере с одним вторым соединением, отличающимся от первого указанного первого соединения, выбранного из сульфисоксазола, метимазола, прилокаина, дифиллина, хинакрин, карбенексолона, акампросата, аминокaproновой кислоты, баклофена, каберголина, диэтилкарбамазина, цинакальцета, циннаризина, эплеренона, фенолдопама, лефлуномида, левосимендана, сулодексида, тербинафина, зонисамида, этомидата, феноформина, триметазидина, мексилетина, бромкриптина, ифенпродила, торасемида и моксифлоксацина или их солей, пролекарств, производных или форм с пролонгированным высвобождением.

В дополнительном воплощении изобретение относится к способу лечения болезни Альцгеймера, связанного с AD расстройства, MS, PD, ALS, HD, невропатий (например, невропатической боли или алкогольной невропатии), алкоголизма или алкогольной абстиненции или поражения спинного мозга у нуждающегося в этом субъекта, по меньшей мере одного первого соединения, выбранного из группы, включающей торасемид, триметазидин, мексилетин, ифенпродил, бромкриптин и моксифлоксацин, их соли, пролекарства, производные или любые составы, в комбинации по меньшей мере с одним вторым соединением, отличающимся от первого указанного первого соединения, выбранного из сульфисоксазола, метимазола, прилокаина, дифиллина, хинакрин, карбенексолона, акампросата, аминокaproновой кислоты, баклофена, каберголина, диэтилкарбамазина, цинакальцета, циннаризина, эплеренона, фенолдопама, лефлуномида, левосимендана, сулодексида, тербинафина, зонисамида, этомидата, феноформина, триметазидина, мексилетина, бромкриптина, ифенпродила, торасемида и моксифлоксацина или их солей, пролекарств, производных или любых составов.

Как описано в примерах, помимо эффективности в защите нейронов из глутаматной токсичности, терапия баклофеном-торасемидом также особенно эффективна в стимуляции нейронального клеточного роста, даже в отсутствие какого-либо экспонирования токсичному агенту или состоянию. Более того, *in vivo* данная комбинированная терапия приводит к улучшению при потере передачи нервного сигнала после поражения нерва. Поэтому комбинация баклофена-торасемида представляет новую и мощную терапию для лечения невропатий, нервных поражений и поражений спинного мозга, определенных выше.

В связи с этим в конкретном воплощении изобретение относится к способу лечения невропатий, например поражений периферических нервов или поражений спинного мозга, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции, включающей соли, пролекарства, производные или любые составы баклофена и торасемида.

В другом конкретном воплощении изобретение относится к способу лечения невропатий, например наследуемых невропатий, таких как СМТ-заболевания, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции, включающей соли, пролекарства, производные или любые составы баклофена и торасемида.

В более конкретном воплощении изобретение относится к способу лечения СМТ1 или СМТ2, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции, включающей соли, пролекарства, производные или любые составы баклофена и торасемида.

Конкретная задача изобретения заключается также в способе лечения невропатий, например поражений периферических нервов или поражений спинного мозга, включающем одновременное, раздельное или последовательное и/или повторное введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества баклофена и торасемида, как описано выше.

Несмотря на прекрасную эффективность *in vitro* и *in vivo*, в зависимости от субъекта или специфического состояния, способы и композиции изобретения могут быть использованы в дополнительной комбинации с дополнительными лекарственными средствами или обработками, благоприятными для лечения неврологического состояния у субъектов. В связи с этим в конкретном воплощении лекарственное средство(а) или композиции по настоящему изобретению могут быть дополнительно объединены с экстрактами *Ginkgo biloba*. Подходящие экстракты включают, без ограничения, экстракты *Ginkgo biloba*, улучшенные экстракты *Ginkgo biloba* (например, обогащенные активными ингредиентами или в которых уменьшено содержание примесей) или любое лекарственное средство, содержащее экстракты *Ginkgo biloba*.

Экстракты *Ginkgo biloba* могут быть использованы в композиции, включающей, по меньшей мере, торасемид, триметазидин, мексилетин, бромкриптин, ифенпродил и моксифлоксацин.

В предпочтительных воплощениях экстракты *Ginkgo biloba* используются в комбинации с любой из следующих комбинаций лекарственных средств:

- Акампросат и Ифенпродил,
- Баклофен и Мексилетин,
- Баклофен и Торасемид,
- Баклофен и Триметазидин,
- Бромкриптин и Сульфисоксазол,
- Цинакальцет и Мексилетин,
- Циннаризин и Триметазидин,
- Эплеренон и Торасемид,
- Сульфисоксазол и Торасемид,
- Триметазидин и Зонисамид,
- Левосимендан и Мексилетин,
- Левосимендан и Ифенпродил,
- Левосимендан и Триметазидин,
- Левосимендан и Моксифлоксацин,
- Тербинафин и Торасемид,
- Моксифлоксацин и Баклофен,
- Моксифлоксацин и Цинакальцет,
- Моксифлоксацин и Зонисамид,
- Моксифлоксацин и Сульфисоксазол,
- Мексилетин и Ифенпродил,
- Баклофен и Триметазидин и Торасемид,
- Баклофен и Цинакальцет и Торасемид,
- Баклофен и Акампросат и Торасемид,
- Сульфисоксазол и Триметазидин и Торасемид и Зонисамид,
- Сульфисоксазол и Мексилетин и Торасемид и Цинакальцет,
- Баклофен и Акампросат и Торасемид и Диэтилкарбамазин,
- Баклофен и Акампросат и Торасемид и Диэтилкарбамазин и Ифенпродил,
- Левосимендан и Баклофен и Триметазидин,
- Левосимендан и Аминокапроевая кислота и Триметазидин,
- Левосимендан и Тербинафин и Триметазидин или
- Левосимендан и Сульфисоксазол и Триметазидин.

Другие терапии, используемые в сочетании с лекарственным средством(ами) или комбинацией(ами) лекарственных средств согласно настоящему изобретению, могут включать одно или несколько лекарственных средств, которые облегчают симптомы болезни Альцгеймера, связанного с AD расстрой-

ства, MS, PD, ALS, HD, невропатий (например, невропатической боли или алкогольной невропатии), алкоголизма или алкогольной абстиненции или поражение спинного мозга или лекарственного средства(в), которое может быть использовано для паллиативного лечения этих расстройств.

Например, комбинации изобретения могут быть использованы в сочетании с донепезилом (CAS: 120014-06-4), габапентилом (CAS: 478296-72-9; 60142-96-3), галантамином (357-70-0), ривастигнином (123441-03-2) или мемантином (CAS: 19982-08-2).

Еще одним объектом изобретения является применение соединения или комбинации соединений, описанных выше, для изготовления лекарственного средства для лечения вышеперечисленных расстройств путем объединенного, раздельного или последовательно введения субъекту, нуждающемуся в этом.

Другим объектом изобретения является способ получения фармацевтической композиции, который включает смешивание вышеуказанных соединений в соответствующем наполнителе или носителе.

Продолжительность лечения также зависит от стадии заболевания или расстройства, подвергаемого лечению, используемой комбинации, возврата и состояния пациента, и от того, как пациент отвечает на лечение. Дозировка, частота и способ введения каждого компонента комбинации могут контролироваться независимо. Например, одно лекарственное средство может вводиться перорально, в то время как второе лекарственное средство может вводиться внутримышечно. Комбинированная терапия может даваться периодическими циклами, которые включают периоды отдыха так, чтобы организм пациента имел возможность восстановиться от все еще присутствующих непредвиденных побочных эффектов. Лекарственные средства также могут быть составлены вместе так, чтобы одним введением доставлялись все лекарственные средства.

Введение каждого лекарственного средства в комбинации может осуществляться любым подходящим средством, которое приводит к концентрации лекарственного средства, которое при объединении с другим компонентом способно облегчить состояние пациента или эффективность лечения заболевания или расстройства.

В то время как для активных ингредиентов возможно введение комбинации в виде чистого химического вещества, предпочтительно представить их в виде фармацевтической композиции, также обозначаемой в данном контексте как фармацевтический состав. Возможные композиции включают те, которые подходят для перорального, ректального, местного (включая чрескожное, буккальное и подъязычное) или парентерального (включая подъязычное, внутримышечное, внутривенное и внутрикожное) введения.

Чаще эти фармацевтические составы прописываются субъекту в "упаковках для пациента", содержащих дозированные единицы или другие средства для введения отмеренных единичных доз для применения в ходе отдельного периода лечения в одиночной упаковке, как правило, в блистерной упаковке. Упаковки для пациента имеют преимущество над традиционными прописями, где фармацевт отделяет обеспечение пациента фармацевтическим средством из нерасфасованного продукта, в том смысле, что пациент всегда имеет доступ к листку-вкладышу в упаковке пациента, как правило, отсутствующей в традиционных рецептах. Было показано, что включение вкладыша улучшает соблюдение инструкций врача. Таким образом, изобретение дополнительно включает фармацевтический состав, как ранее было описано в данном документе, в комбинации с упаковочным материалом, подходящим для указанных составов. В такой упаковке для пациента целевое применение состава для комбинированного лечения может быть выведено с помощью инструкций, приспособлений, предписаний, адаптации и/или других средств при помощи использования состава, наиболее подходящего для лечения. Такие меры делают упаковку для пациента особенно подходящей и адаптированной для применения при лечении комбинацией настоящего изобретения.

Лекарственное средство может содержаться, в любом соответствующем количестве, в любом подходящем веществе-носителе (например, наполнителе, носителе, подложке), которые могут составлять 1-99% по массе от общей массы композиции. Композиция может быть представлена в дозированной форме, которая подходит для перорального, парентерального (например, внутривенного, внутримышечного), ректального подкожного, назального, вагинального, ингаляционного, кожного (пластырь) или глазного путей введения. Таким образом, композиция может быть в форме, например, таблеток, капсул, пилюль, порошков, гранулятов, суспензий, эмульсий, растворов, гелей, включая гидрогели, паст, мазей, кремов, пластырей, дозаторов для перорального введения, осмотических устройств для доставки, суппозиторий, клизм, лекарственных форм для инъекций, имплантов, спреев и аэрозолей.

Фармацевтические композиции могут быть составлены согласно стандартной фармацевтической практике (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20<sup>th</sup> ed.), ed. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 и Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J.C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York).

Фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть составлены для высвобождения активного лекарственного средства фактически сразу же после введения или в любое заданное время или период времени после введения.

Составы для контролируемого высвобождения включают (i) составы, которые создают фактически постоянную концентрацию лекарственного средства в организме в течение длительного периода време-

ни; (ii) составы, которые после предварительно определенного лаг-периода создают фактически постоянную концентрацию лекарственного средства в организме в течение длительного периода времени; (iii) составы, которые поддерживают действие лекарственного средства в течение предварительно определенного периода времени путем поддержания сравнительно постоянного эффективного уровня лекарственного средства в организме с сопутствующей минимизацией нежелательных побочных эффектов, связанных с флуктуациями в уровне плазмы вещества активного лекарственного средства; (iv) составы, которые локализуют действие лекарственного средства, например пространственным расположением композиции с контролируемым высвобождением вблизи к или в больной ткани или органе; и (v) составы, которые направляют действие лекарственного средства с помощью носителей или химических производных для доставки лекарственного средства в конкретный тип целевых клеток.

Введение лекарственных средств в форме состава для контролируемого высвобождения особенно предпочтительно в случаях, при которых лекарственное средство обладает (i) узким терапевтическим диапазоном (т.е. незначительное различие между концентрацией в плазме, приводящей к вредным побочным эффектам или токсическим реакциям, и концентрацией в плазме, приводящей к терапевтическому эффекту; в общем, терапевтический диапазон (ТД) определяется как соотношение дозы половинной смертности ( $LD_{50}$ ) к средней эффективной дозе ( $ED_{50}$ )); (ii) узким окном абсорбции в желудочно-кишечном тракте или (iii) очень коротким периодом полужизни для того, чтобы частое дозирование в ходе дня потребовалось для поддержания уровня в плазме на терапевтическом уровне.

Любое количество стратегий может быть использовано для получения контролируемого высвобождения, при котором скорость высвобождения превосходит скорость метаболизма рассматриваемого лекарственного средства. Контролируемое высвобождение может быть получено соответствующим отбором различных параметров состава и ингредиентов, включая, например, различные типы композиций и покрытий для контролируемого высвобождения. Таким образом, лекарственное средство составлено с соответствующими наполнителями в фармацевтическую композицию, которая, при введении, высвобождает лекарственное средство контролируемым образом (одно- или многоэлементная таблетки или композиции капсул, масляные растворы, суспензии, эмульсии, микрокапсулы, микросферы, наночастицы, пленки и липосомы).

Твердые дозированные формы для перорального применения.

Составы для перорального применения включают таблетки, содержащие активный(ые) ингредиент(ы) в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми наполнителями. Эти наполнители могут представлять собой, например, инертные разбавители или наполнители (например, сахарозу, микрокристаллическую целлюлозу, крахмалы, включая картофельный крахмал, карбонат кальция, хлорид натрия, фосфат кальция, сульфат кальция или фосфат натрия); гранулирующие и разрыхляющие агенты (например, производные целлюлозы, включая микрокристаллическую целлюлозу, крахмалы, включая картофельный крахмал, кроскармеллозу натрия, альгинаты или альгиновую кислоту); связующие агенты (например, акациевую камедь, альгиновую кислоту, альгинат натрия, желатин, крахмал, прежелатинизированный крахмал, микрокристаллическую целлюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, этилцеллюлозу, поливинилпирролидон или полиэтиленгликоль) и смазывающие агенты, глицеролы и антиадгезивы (например, стеариновую кислоту, оксид кремния или тальк). Другие фармацевтически приемлемые наполнители могут быть красителями, вкусовыми агентами, пластификаторами, увлажнителями, буферными агентами и т.п.

Таблетки могут быть непокрытыми или они могут быть покрыты известными способами, необязательно для задержки разрыхления и абсорбции в желудочно-кишечном тракте, что обеспечивает замедленное действие в течение более длительного периода. Покрытие может быть адаптировано для высвобождения активного вещества лекарственного средства в предварительно определенном паттерне (например, для получения состава с контролируемым высвобождением) или покрытие может быть адаптировано не высвобождать активное вещество лекарственного средства до прохождения через желудок (кишечное покрытие). Покрытие может представлять собой сахарное покрытие, пленочное покрытие (например, основанное на гидроксипропилцеллюлозе, метилцеллюлозе, метилгидроксиэтилцеллюлозе, гидроксипропилцеллюлозе, карбоксиметилцеллюлозе, акрилатных кополимерах, полиэтиленгликолях и/или поливинилпирролидоне) или кишечное покрытие (например, основанное на кополимере метакриловой кислоты, ацетат фталате целлюлозы, фталате гидроксипропилметилцеллюлозы, ацетат сукцинате гидроксипропилметилцеллюлозы, поливинилацетат фталате, щелаче и/или этилцеллюлозе). Может быть использован материал для задержки по времени, такой как, например, глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат.

Твердые таблетированные композиции могут включать покрытие, адаптированное для защиты композиции от нежелательных химических изменений (например, химической деградации перед высвобождением активного вещества лекарственного средства). Покрытие может быть нанесено на твердую дозированную форму так же, как описано в энциклопедии фармацевтической технологии.

Лекарственные средства могут быть смешаны вместе в таблетке или могут быть разделены. Например, первое лекарственное средство содержится внутри таблетки, а второе лекарственное средство содержится снаружи таблетки, так что существенная часть второго лекарственного средства высвобождает

ется перед высвобождением первого лекарственного средства.

Составы для перорального применения также могут быть представлены в виде жевательных таблеток, или в виде твердых желатиновых капсул, где активный ингредиент смешан с инертным твердым растворителем (например, картофельным крахмалом, микрокристаллической целлюлозой, карбонатом кальция, фосфатом кальция или каолином), или в виде мягких желатиновых капсул, где активный ингредиент смешан с водой или масляной средой, например жидким парафином или оливковым маслом. Порошки и грануляты могут быть получены с помощью ингредиентов, упомянутых выше для таблеток и капсул обычным образом.

Композиции контролируемого высвобождения для перорального применения могут быть, например, сконструированы для высвобождения активного лекарственного средства путем контроля растворения и/или диффузии активного вещества лекарственного средства.

Высвобождение, контролируемое растворением или диффузией, может быть достигнуто соответствующим покрытием таблетки, капсулы, пеллеты или гранулированного состава лекарственных средств или путем включения лекарственного средства в соответствующую матрицу. Покрытие с контролируемым высвобождением может включать одно или несколько веществ для покрытия, упомянутых выше, и/или, например, шеллак, пчелиный воск, Glycowax, касторовый воск, карнаубский воск, стеариловый спирт, моностеарат глицерина, дистеарат глицерина, глицерин пальмитостеарат, этилцеллюлозу, полиакрилаты, DL-молочную кислоту, ацетат-бутират целлюлозы, поливинилхлорид, поливинилацетат, винилпирролидон, полиэтилен, полиметакрилат, метилметакрилат, 2-гидрокси-метакрилат, гидрогели метакрилата, 1,3-бутиленгликоль, этиленгликоль метакрилата и/или полиэтиленгликоли. В составе матрицы с контролируемым высвобождением материал матрицы может включать, например, гидрированную метилцеллюлозу, карнаубский воск и стеариловый спирт, карбопол 934, силикон, глицерил тристеарат, метил акрилат - метил метакрилат, поливинил хлорид, полиэтилен и/или галогенированный фтороуглерод.

Композиция с контролируемым высвобождением, содержащая одно или несколько лекарственных средств из числа заявленных комбинаций, также может находиться в виде всплывающей таблетки или капсулы (т.е. таблетки или капсулы, которая при пероральном введении плавает на поверхности желудочного содержимого в течение определенного периода времени). Состав всплывающей таблетки лекарственного(ых) средства(в) может быть получен грануляцией смеси лекарственного(ых) средства(в) с наполнителями и 20-75% мас./мас. гидроколлоидов, таких как гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза или гидроксипропилметилцеллюлоза. Полученные гранулы затем могут быть спрессованы в таблетки. При контакте с желудочным соком таблетка образует фактически водонепроницаемый гелевый барьер вокруг своей поверхности. Этот гелевый барьер принимает участие в поддержании плотности менее чем единица, тем самым позволяя таблетке оставаться плавучей в желудочном соке.

Липиды для перорального введения.

Порошки, диспергируемые порошки или гранулы, подходящие для приготовления водной суспензии путем добавления воды, являются обычными дозированными формами для перорального введения. Состав в виде суспензии обеспечивает активный ингредиент в смеси с диспергируемым или увлажняющим агентом, суспендирующим агентом и одним или несколькими консервантами. Подходящими суспендирующими агентами являются, например, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, метилцеллюлоза, альгинат натрия и т.п.

Парентеральные композиции.

Фармацевтическая композиция также может быть введена парентерально инъекцией, инфузией или имплантацией (внутривенной, внутримышечной, подкожной и т.п.) в дозированных формах, составах или через подходящие устройства доставки или импланты, содержащие обычные, нетоксичные фармацевтически приемлемые носители или адьюванты. Составление и приготовление таких композиций хорошо известны специалистам в области фармацевтических составов.

Композиции для парентерального применения могут быть представлены в единичных дозированных формах (например, в однодозовых ампулах) или во флаконах, содержащих несколько доз и в которые может быть добавлен подходящий консервант (см. ниже). Композиция может быть в форме раствора, суспензии, эмульсии, инфузионного устройства или устройства доставки для имплантации или может быть представлена в виде сухого порошка, восстанавливаемого перед применением водой или другим подходящим носителем. Кроме активных(ого) лекарственных(ого) средств(а) композиция может включать подходящие парентерально приемлемые носители и/или наполнители. Активное(ые) лекарственное(ые) средство(а) может быть введено в микросферы, микрокапсулы, наночастицы, липосомы или т.п. для контролируемого высвобождения. Композиция может включать суспендирующие, солюбилизующие, стабилизирующие, рН-корректирующие агенты и/или диспергирующие агенты.

Фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть в форме, подходящей для стерильной инъекции. Для подготовки такой композиции подходящее активное(ые) лекарственное(ые) средство(а) растворено(ы) или суспендировано(ы) в парентерально приемлемом жидком носителе. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые могут быть использованы, - вода, вода, скорректированная до подходящего рН путем добавления соответствующего количества соляной кислоты, гидроксид

да натрия, или подходящий буфер, 1,3-бутандиол, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Водный состав также может содержать один или несколько консервантов (например, метил, этил или н-пропил п-гидроксibenзоат). В случаях, когда одно из лекарственных средств только незначительно или слабо растворимо в воде, может быть добавлен агент, усиливающий растворение, или солюбилизующий агент или растворитель может включать 10-60% пропиленгликоля или т.п.

Парентеральные композиции с контролируемым высвобождением могут быть в форме водных суспензий, микросфер, микрокапсул, магнитных микросфер, масляных растворов, масляных суспензий или эмульсий. В ином случае активное(ые) лекарственное(ые) средство(а) может быть включено в биосовместимые носители, липосомы, наночастицы, импланты или устройства для инфузии. Материалами для применения при изготовлении микросфер и/или микрокапсул являются, например, биodeградируемые/биоразлагаемые полимеры, такие как полигалактин, поли(изобутил цианоакрилат), поли(2-гидроксиэтил-L-глутамин). Биосовместимые носители, которые могут быть использованы при составлении парентеральных составов с контролируемым высвобождением, являются углеводами (например, декстранами), белками (например, альбумином), липопротеинами или антителами. Материалы для применения в имплантах могут быть биodeградируемыми (например, поли(капролактоном), поли(гликолевой кислотой) или поли(ортоэфирами)).

Альтернативные пути.

Могут рассматриваться другие пути введения и, следовательно, другие составы, хотя и являющиеся менее предпочтительными и менее удобными. В связи с этим для ректального применения подходящие дозированные формы для композиции включают суппозитории (типа эмульсии или суспензии) и ректальные желатиновые капсулы (растворы и суспензии). В составе типичного суппозитория активное(ые) лекарственное(ые) средство(а) объединяются с соответствующей фармацевтически приемлемой основой для суппозитория, такой как масло какао, этерифицированные жирные кислоты, глицериновокислый желатин и различные водорастворимые или диспергируемые основы, подобные полиэтиленгликолям. Могут быть введены различные добавки, усилители или поверхностно-активные вещества.

Фармацевтические композиции также могут быть введены местно на кожу для чрескожной абсорбции в дозированных формах или составах, содержащих обычно нетоксичные фармацевтически приемлемые носители и наполнители, включая микросферы и липосомы. Составы включают кремы, мази, лосьоны, линименты, гели, гидрогели, растворы, суспензии, палочки, спреи, пасты, пластыри и другие виды систем трансдермальной доставки лекарственных средств. Фармацевтически приемлемые носители или наполнители могут включать эмульгирующие агенты, антиоксиданты, буферные агенты, консерванты, увлажнители, усилители проникновения, хелатирующие агенты, гель-формирующие агенты, основы мазей, парфюмерию и агенты для защиты кожи.

Консерванты, увлажнители, усилители проникновения могут быть парабенами, такими как метил или пропил п-гидроксibenзоат и хлорид бензалкония, глицерин, пропилен гликоль, мочевины и т.п.

Фармацевтические композиции, описанные выше, для местного введения на кожу также могут быть использованы в сочетании с местным введением на или около части тела, которая подлежит лечению. Композиции могут быть адаптированы для прямого применения или для применения посредством специальных устройств для доставки лекарственных средств, таких как повязки или в ином случае пластыри, прокладки, губки, ленты или другие формы подходящего гибкого материала.

Дозировки и длительность обработки.

Следует иметь в виду, что лекарственные средства комбинаций могут быть введены одновременно, либо в одной, либо в различных фармацевтических составах, либо последовательно. Если существует последовательное введение, задержка при введении второго (или дополнительного) активного ингредиента не должна быть таковой, чтобы потерять преимущество действенного эффекта комбинации активных ингредиентов. Минимальное требование для комбинации по этому описанию заключается в том, что комбинация должна быть предназначена для объединенного применения с преимуществом действенного эффекта комбинации активных ингредиентов. Целевое применение комбинации может быть установлено с помощью приспособлений, предписаний, адаптации и/или других средств, чтобы помочь с использованием комбинации в соответствии с изобретением.

Хотя активные лекарственные средства настоящего изобретения могут быть введены в дробных дозах, например, два или три раза в день, одиночная ежедневная доза каждого лекарственного средства в комбинации является предпочтительной, с одиночной ежедневной дозой для всех лекарственных средств в одиночной фармацевтической композиции (единичная дозированная форма), являющейся наиболее предпочтительной.

Термин "единичная дозированная форма" относится к физически дискретным единицам (таким как капсулы, таблетки или загруженные цилиндры шприцов), подходящим в качестве унитарных дозровок для испытуемых людей, при этом каждая единица содержит предварительно определенное количество активного материала или материалов, рассчитанных для получения искомого терапевтического эффекта, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем.

Введение, как правило, повторяют. Введение может быть осуществлено от одного до нескольких раз ежедневно в течение периода времени от нескольких дней до нескольких лет и может даже осуществляться в течение всей жизни пациента. Хроническое или, по меньшей мере, периодически повторяемое введение указано в большинстве случаев.

Кроме того, фармакогеномная (влияние генотипа на фармакокинетический, фармакодинамический профиль или профиль эффективности терапевтического средства) информация о конкретном пациенте может влиять на используемую дозировку.

За исключением ответа на конкретные случаи ухудшения, когда могут быть необходимы более высокие дозировки, предпочтительная дозировка каждого лекарственного средства в комбинации будет находиться в диапазоне доз не выше дозировки, обычно прописываемой для долгосрочного поддерживающего лечения или являющейся доказано безопасной в фазе 3 клинических исследований.

Одно значительное преимущество изобретения заключается в том, что каждое соединение может быть использовано в низких дозировках в комбинированной терапии, при этом продуцируя, в комбинации, существенную клиническую пользу для пациента. Комбинированная терапия действительно может быть эффективной в дозах, при которых соединения индивидуально не имеют фактического эффекта. Соответственно, конкретным преимуществом изобретения является возможность применения каждого из соединений в субоптимальных дозах, т.е. дозах, которые ниже, чем обычно прописываемые терапевтические дозы, предпочтительно 1/2 от терапевтических доз, более предпочтительно 1/3, 1/4, 1/5 или даже еще более предпочтительно 1/10 от терапевтических доз. В конкретных примерах используются дозы вплоть до 1/20, 1/30, 1/50, 1/100 или даже ниже от терапевтических доз.

При таких субоптимальных дозах соединения отдельно будут, по существу, неактивны, хотя комбинация(и) по изобретению является полностью эффективной.

Предпочтительная дозировка соответствует количествам от 1 вплоть до 50% от тех, что обычно прописывают для долгосрочного поддерживающего лечения.

Наиболее предпочтительная дозировка может соответствовать количествам от 1 вплоть до 10% от тех, что обычно прописывают для долгосрочного поддерживающего лечения.

Специальные примеры дозировок лекарственных средств для применения в изобретении представлены ниже:

Бромокриптин перорально от около 0,01 до 10 мг/день, предпочтительно менее чем 5 мг/день, более предпочтительно менее чем 2,5 мг/день, еще более предпочтительно менее чем 1 мг/день, такие дозы особенно подходят для перорального введения;

Ифенпродил перорально от около 0,4 до 6 мг/день, предпочтительно менее чем 3 мг/день, более предпочтительно менее чем 1,5 мг/день, еще более предпочтительно менее чем 0,75 мг/день, такие дозировки особенно подходят для перорального введения;

Мексилетин перорально от около 6 до 120 мг/день, предпочтительно менее чем 60 мг/день, более предпочтительно менее чем 30 мг/день, еще более предпочтительно менее чем 15 мг/день, такие дозировки особенно подходят для перорального введения;

Моксифлоксацин перорально от около 4 до 40 мг/день, предпочтительно менее чем 20 мг/день, более предпочтительно менее чем 10 мг/день, еще более предпочтительно менее чем 5 мг/день, такие дозировки особенно подходят для перорального введения;

Торасемид перорально от около 0,05 до 4 мг/день, предпочтительно менее чем 2 мг/день, более предпочтительно менее чем 1 мг/день, еще более предпочтительно менее чем 0,5 мг/день, такие дозировки особенно подходят для перорального введения;

Триметазидин перорально от около 0,4 до 6 мг/день, предпочтительно менее чем 3 мг/день, более предпочтительно менее чем 1,5 мг/день, еще более предпочтительно менее чем 0,75 мг/день, такие дозировки особенно подходят для перорального введения;

Акампросат перорально от около 1 до 400 мг/день;

Аминокaproновая кислота перорально от около 0,1 г до 2,4 г в день;

Баклофен от 0,01 до 150 мг/день, предпочтительно менее чем 100 мг/день, более предпочтительно менее чем 50 мг/день, наиболее предпочтительно от 5 до 40 мг/день, еще более предпочтительно менее чем 35 мг/день, обычно 15 мг/сутки, 12 мг/сутки, 24 мг/день, 30 мг/день, такие дозировки особенно подходят для перорального введения;

Диэтилкарбамазин перорально от около 0,6 до 600 мг/день;

Цинакальцет перорально от около 0,3 до 36 мг/день;

Циннаризин от около 0,6 до 23 мг/день;

Эплеренон перорально от около 0,25 до 10 мг/день;

Лефлуномид перорально от около 0,1 до 10 мг/день;

Левосимендан перорально от около 0,04 до 0,8 мг/день;

Сульфисоксазол перорально от около 20 до 800 мг/день;

Сулодексид перорально от около 0,05 до 40 мг/день;

Тербинафин перорально от около 2,5 до 25 мг/день;

Зонисамид перорально от около 0,5 до 50 мг/день.

Следует понимать, что количество фактически вводимого лекарственного средства будет определяться врачом, в свете сопутствующих обстоятельств, включая условие или условия, подлежащие лечению, точная вводимая композиция, возраст, масса и ответ индивидуального пациента, тяжесть симптомов пациента и выбранный путь введения. Следовательно, вышеуказанные диапазоны дозировок предназначены для обеспечения общего руководства и поддержки изложенного в данном документе, но не предназначены для ограничения рамок изобретения.

Следующие примеры представлены для иллюстрации и никоим образом не для ограничения.

### Примеры

Уход и содержание животных, а также эксперименты осуществляли в соответствии с руководствами Комитета по исследованиям и этическим проблемам I.A.S.P. (1983).

А) Лечение заболеваний, связанных с токсичностью  $A\beta$ .

В этих сериях экспериментов соединения-кандидаты были протестированы на их способность предотвращать или снижать токсичные эффекты человеческого  $A\beta_{1-42}$ .  $A\beta_{1-42}$  является полноразмерным пептидом, из которого состоят агрегаты, обнаруженные в биопсиях из пациентов-людей, пораженных AD. Лекарственные средства вначале тестировали индивидуально, а затем с помощью тестов на их комбинированное действие. Эффект определяли на различных типах клеток, для того чтобы дополнительно документировать активность соединений в *in vitro* моделях, которые иллюстрируют различные физиологические признаки AD. *In vivo* исследования также осуществляли в мышинной модели для подтверждения защитного эффекта против AD путем оценки эффекта соединений на i) когнитивную деятельность животных и ii) молекулярные маркеры AD (индукция апоптоза, индукция окислительного стресса, индукция воспалительного пути).

I. Соединения, предотвращающие токсичность человеческого  $A\beta_{1-42}$ .

I.1. Защита против токсичности  $A\beta_{1-42}$  в модели микрососудистых эндотелиальных клеток человеческого мозга.

Культуры микрососудистых эндотелиальных клеток человеческого мозга использовали для исследования защиты, оказываемой кандидатным(и) соединением(ями) в случае токсичности  $A\beta_{1-42}$ .

Микрососудистые эндотелиальные церебральные клетки человеческого мозга (НВМЕС, ScienCell Ref: 1000, замороженные на 10 пассаже) быстро размораживали в водяной бане при 37°C. Надосадочную жидкость незамедлительно помещали в 9 мл среды Игла, модифицированной Дульбекко ((DMEM; Pan Biotech ref: P04-03600), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS; GIBCO ref 10270-106). Клеточную суспензию центрифугировали при 180×g в течение 10 мин при 4°C и осадок суспендировали в CSC бессывороточной среде (CSC serum free, Cell System, Ref: SF-4Z0-500-R, партия 51407-4) с 1,6% "Serum free RocketFuel" (Cell System, Ref: SF-4Z0-500-R, партия 54102), 2% пенициллина 10000 Ед./мл и стрептомицина 10 мг/мл (PS; Pan Biotech ref: P06-07100, партия 133080808) и рассевали с плотностью 20000 клеток/лунку в 96-луночных планшетах (ангиогенная система "matrigel layer biocoat angiogenesis system", BD, Ref 354150, партия A8662) в конечном объеме 100 мкл. На подложке из матригеля эндотелиальные церебральные клетки спонтанно начинали процесс морфогенеза капиллярной сети (33).

На состоянии получали по три отдельных культуры, 6 лунок на состояние.

Обработка соединениями-кандидатами и человеческим амилоидом- $\beta_{1-42}$ .

Вкратце, пептид  $A\beta_{1-42}$  (Bachem, ref: H1368 batch 1010533) восстанавливали в определенной культуральной среде до 20 мкМ (материнский раствор) и медленно перемешивали при 37°C в течение 3 дней в темноте для агрегации. Контрольную среду получали в таких же условиях.

Через 3 дня этот агрегированный человеческий амилоидный пептид использовали на НВМЕС в концентрации 2,5 мкМ, разведенным в контрольной среде (оптимальное время инкубации). Пептид  $A\beta_{1-42}$  добавляли через 2 ч после рассеивания НВМЕС на матригель в течение 18-часовой инкубации.

Через 1 ч НВМЕС рассевали на матригель, тестовые соединения и VEGF-165 растворяли в культуральной среде (+0,1% DMSO) и затем предварительно инкубировали с НВМЕС в течение 1 ч до применения  $A\beta_{1-42}$  (в конечном объеме на культуральную лунку 100 мкл). Через 1 ч инкубации с тестовыми соединениями или VEGF (2 ч после рассеивания клеток на матригель), 100 мкл пептида  $A\beta_{1-42}$  добавляли до конечной концентрации 2,5 мкМ, разведенного в контрольной среде в присутствии тестовых соединений или VEGF (в общем объеме 200 мкл/лунку), для того, чтобы избежать дальнейших разведений лекарственного средства.

Организация культуральных плашек.

VEGF-165, известный как проангиогенная изоформа VEGF-A, использовали для всех экспериментов в данном исследовании в качестве эталонного соединения. VEGF-165 является одной из наиболее распространенных изоформ VEGF, вовлеченных в ангиогенез. VEGF использовали как источник тестового соединения при 10 нМ.

Следующие состояния были подвергнуты оценке:

Отрицательный контроль, среда отдельно +0,1% ДМСО.

Инттоксикация: амилоид- $\beta_{1-42}$  (2,5 мкМ) в течение 18 ч.

Положительный контроль: VEGF-165 (10 нМ) (1 эталонное соединение/культура) 1 ч до добавления  $A\beta_{1-42}$  (2,5 мкМ) в течение 18-часового периода инкубирования.

Тестовые соединения: Тестовое соединение за 1 ч перед добавлением  $A\beta_{1-42}$  (2,5 мкМ) в течение 18-часового периода инкубирования.

Количественный анализ капиллярной сети.

На лунку делали по два изображения с помощью InCell Analyzer 1000™ (GE Healthcare) в режиме световой трансмиссии с 4× увеличением. Все изображения получали в одинаковых условиях. Анализ сетей ангиогенеза осуществляли с помощью программного обеспечения Developer (GE Healthcare). Оценивали общую длину капиллярной сети.

Обработка данных.

Все значения выражены как среднее  $\pm$  s.e. среднее 3 культур ( $n=6$  на состояние). Статистические анализы проводили в других условиях (путем осуществления дисперсионного анализа, затем критерия Даннета, когда это возможно, программа Statview software version 5.0). Значения (как %) вставляли в графики, демонстрирующие эволюцию токсичности амилоида. Фактически амилоидная токсичность была взята за 100%, а влияние тестовых веществ рассчитывали как % этой амилоидной токсичности.

Результаты.

Результаты представлены на фиг. 2. Они продемонстрировали, что лекарственные средства отдельно индуцируют существенный защитный эффект против токсичности, вызванной пептидом  $A\beta_{1-42}$ :

Торасемид, в низкой дозировке, например 400 нМ, индуцирует сильный защитный эффект;

Бромокриптин, в низкой дозировке, например 3,2 нМ, индуцирует сильный защитный эффект.

Результаты также показывают, что неожиданно верхняя или нижняя концентрация лекарственных средств по сравнению с вышеупомянутыми концентрациями лекарственных средств может ухудшить или имеет меньший или отсутствующий эффект на токсичность  $A\beta_{1-42}$  в данной модели.

1.2. Защита против токсичности  $A\beta_{1-42}$  на первичные кортикальные нейрональные клетки.

Обработка тестовым веществом и человеческим амилоидом  $\beta_{1-42}$ .

Крысиные кортикальные нейроны культивировали, как описано Singer et al. (42). Вкратце, беременных самок крыс с 15-дневными беременностями забивали смещением шейных позвонков (Rats Wistar) и удаляли плоды из матки. Кортекс удаляли и помещали в ледяную среду Лейбовица (L15), содержащую 2% пенициллин 10000 Ед./мл и стрептомицин 10 мг/мл и 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA). Кору диссоциировали трипсином в течение 20 мин при 37°C (0,05%). Реакцию останавливали добавлением модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM), содержащей ДНКазу I категории II и 10% фетальной телячьей сыворотки (FSC). Клетки затем механически диссоциировали тремя серийными пассажами через 10-мл пипетку и центрифугировали при 515×g в течение 10 мин при 4°C. Надосадочную жидкость отбрасывали и осадок клеток ресуспендировали в определенной культуральной среде, содержащей Neurobasal, обогащенной B27 (2%), L-глутамин (0,2 мМ), 2% раствора PS и 10 нг/мл BDNF. Живые клетки подсчитывали в цитометре Neubauer с помощью теста исключения трипанового синего. Клетки рассеивали при плотности 30000 клеток/лунку в 96-луночных планшетах (лунки предварительно покрывали с помощью поли-L-лизина (10 мкг/мл)) и культивировали при 37°C в увлажненной воздушной (95%)/CO<sub>2</sub> (5%) атмосфере.

Вкратце, пептид  $A\beta_{1-42}$  восстанавливали в определенной культуральной среде в концентрации 40 мкМ (материнский раствор) и медленно встряхивали при 37°C в течение 3 дней в темноте для агрегации. Контрольную среду получали в таких же условиях.

Через 3 дня раствор использовали на первичных кортикальных нейронах следующим образом.

Через 10 дней культивирования нейронов лекарственное средство растворяли в культуральной среде (+0,1% ДМСО) и затем предварительно инкубировали с нейронами в течение 1 ч перед применением  $A\beta_{1-42}$  (в конечном объеме на культуральную лунку 100 мкл). Через 1 ч инкубации лекарственного средства(в) 100 мкл пептида  $A\beta_{1-42}$  добавляли в конечной концентрации 100 мкМ разведенных в присутствии лекарственного средства(в), для того чтобы избежать дальнейшего разведения лекарственных средств. Кортикальные нейроны интоксцировали в течение 24 ч. На состояние были получены по три отдельных культуры, 6 лунок на состояние.

BDNF (50 нг/мл) и эстрадиол- $\beta$  (150 нМ) использовали в качестве положительного контроля и эталонных соединений соответственно.

Организация культуральных плашек.

Эстрадиол- $\beta$  в концентрации 150 нМ использовали в качестве положительного контроля.

Эстрадиол- $\beta$  растворяли в культуральной среде и предварительно инкубировали в течение 1 ч для применения с агрегированным амилоидом  $A\beta_{1-42}$ . Следующие состояния были подвергнуты оценке:

Контрольное пятно: 12 лунок/состояние:

отрицательный контроль: среда отдельно + 0,1% ДМСО,

интоксикация: амилоид  $\beta_{1-42}$  (10 мкМ) в течение 24 ч,

эталонное соединение: эстрадиол (150 нМ) 1 ч.

Планшет с лекарственным средством: 6 лунок/состояние:

отрицательный контроль: среда отдельно + 0,1% ДМСО,

интоксикация: амилоид  $\beta_{1-42}$  (10 мкМ) в течение 24 ч,

лекарственное средство: лекарственное средство - 1 ч, затем амилоид  $\beta_{1-42}$  (10 мкМ) в течение 24 ч. Тест активности лактатдегидрогеназы (LDH).

Через 24 ч после интоксикации надосадочную жидкость отделяли и анализировали с помощью набора для детекции цитотоксичности (LDH, Roche Applied Science, учетный номер: 11644793001, партия: 11800300). Этот колориметрический тест для количественного определения клеточной цитотоксичности основан на измерении активности лактатдегидрогеназы, высвобожденной из цитозоля умирающих клеток в надосадочную жидкость.

Обработка данных.

Все значения выражены как среднее  $\pm$  s.e. среднее 3 культур (n=6 на состояние). Статистические анализы осуществляли в других условиях (дисперсионный анализ, затем критерий Даннета, когда это возможно, программа Statview, версия 5.0).

Результаты.

Результаты, полученные для индивидуальных выбранных лекарственных средств в анализах токсичности на первичных кортикальных нейрональных клетках, представлены на фиг. 2, 26 и 27. Они продемонстрировали, что лекарственные средства отдельно индуцируют существенный защитный эффект против токсичности, вызванной пептидом  $A\beta_{1-42}$ :

Триметазидин, в низкой дозировке, например 40 нМ, индуцирует сильный защитный эффект;

Мексилетин, уже в дозировке 3,2 нМ индуцирует сильный защитный эффект;

Бромкриптин, уже в дозировке 40 нМ индуцирует сильный защитный эффект;

Ифенпродил, уже в дозировке 3,2 нМ индуцирует сильный защитный эффект;

Моксифлоксацин, уже в дозировке 20 нМ индуцирует сильный защитный эффект.

Торасемид, в дозировке 200 нМ индуцирует сильный защитный эффект.

Гомотаурин, в дозировке 8 нМ индуцирует сильный защитный эффект.

Полученные результаты также показывают, что, неожиданно, концентрации лекарственных средств выше и ниже тех, что указаны ранее, могут ухудшить или имеют меньший или отсутствующий защитный эффект по отношению к токсичности  $A\beta_{1-42}$  на нейрональных клетках.

II. Комбинированные терапии предотвращают токсичность человеческого  $A\beta_{1-42}$ .

II.1. Влияние комбинированных терапий на токсичность человеческого пептида  $A\beta_{1-42}$  на человеческих клетках НВМЕС.

Эффективность комбинации лекарственных средств изобретения оценивали на человеческих клетках. Протокол, который используется в этих тестах, является тем же, что описан в разделе I.1.

Результаты.

Все протестированные комбинации лекарственных средств дают защитный эффект против токсичности человеческого пептида  $A\beta_{1-42}$  на модели НВМЕС, как показано в табл. 3 и проиллюстрировано на фиг. 3-6 и 13, 14. Результаты ясно показывают, что интоксикация агрегированным человеческим амилоидным пептидом ( $A\beta_{1-42}$  2,5 мкМ) значительно предотвращается комбинациями изобретения, тогда как при этих концентрациях лекарственные средства отдельно не оказывают значимого эффекта на интоксикацию в экспериментальных условиях, описанных выше.

Таблица 3

Комбинация лекарственных средств	Защитный эффект в клетках НВМЕС, интоксцированных $A\beta_{1-42}$
Баклофен и Торасемид	+
Эплеренон и Торасемид,	+
Бромокриптин и Сульфисоксазол,	+
Сульфисоксазол и Торасемид	+
Тербинафин и Торасемид,	+
Мексилетин и Цинакальцет	+
Баклофен и Триметазидин и Торасемид,	+
Баклофен и Цинакальцет и Торасемид	+
Баклофен и Акампросат и Торасемид	+
Сульфисоксазол и Триметазидин и Торасемид и Зонисамид	+
Сульфисоксазол и Мексилетин и Торасемид и Цинакальцет	+
Баклофен и Акампросат и Торасемид и Диэтилкарбамазин	+
Баклофен и Акампросат и Торасемид и Диэтилкарбамазин и Ифенпродил	+
Левосимендан и Баклофен и Триметазидин	+
Левосимендан и Аминокапроевая кислота и Триметазидин	+
Левосимендан и Тербинафин и Триметазидин	+
Левосимендан и Сульфисоксазол и Триметазидин	+

Приведенные в качестве примеров на фиг. 3-6, 13 и 14, следующие комбинации лекарственных средств дают особенно интересные защитные эффекты против токсичности человеческого пептида  $A\beta_{1-42}$  при интоксикации клеток НВМЕС:

Баклофен и Торасемид,  
Сульфисоксазол и Торасемид,  
Торасемид и Эплеренон,  
Сульфисоксазол и Бромокриптин,  
Терминафин и Торасемид или  
Цинакальцет и Мексилетин.

II.2. Влияние комбинированных терапий на токсичность человеческого пептида  $A\beta_{1-42}$  на первичных кортикальных клетках.

Эффективность комбинаций лекарственных средств изобретения оценивали на первичных кортикальных нейрональных клетках. Протокол, который используется в этих тестах, является таким же, как в разделе I.2.

Результаты.

Все протестированные комбинации лекарственных средств оказали защитное влияние против токсичности человеческого пептида  $A\beta_{1-42}$  в первичных кортикальных нейрональных клетках, как показано в табл. 4 и проиллюстрировано на фиг. 7-12 и 16-22. Результаты ясно показывают, что интоксикация агрегированным человеческим амилоидным пептидом ( $A\beta_{1-42}$  10 мкМ) значительно предотвращается комбинациями изобретения, тогда как при этих концентрациях лекарственные средства отдельно не оказывают значимого эффекта на интоксикацию экспериментальных условий, описанных выше.

Таблица 4

Комбинация лекарственных средств	Защитный эффект в интоксцированных $A\beta_{1-42}$ первичных кортикальных нейрональных клетках
Акампросат и Ифенпродил	+
Баклофен и Мексилетин	+
Баклофен и Триметазидин	+
Баклофен и Торасемид	+
Цинакальцет и Мексилетин	+
Циннаризин и Триметазидин	+
Триметазидин и Зонисамид	+
Левосимендан и Мексилетин	+
Левосимендан и Ифенпродил	+
Левосимендан и Триметазидин	+
Левосимендан и Моксифлоксацин	+
Мексилетин и Ифенпродил	+
Моксифлоксацин и Баклофен	+
Моксифлоксацин и Цинакальцет	+
Моксифлоксацин и Триметазидин	+
Моксифлоксацин и Сульфисоксазол	+
Моксифлоксацин и Зонисамид	+
Торасемид и Сульфисоксазол	+
Баклофен и Триметазидин и Торасемид	+
Баклофен и Цинакальцет и Торасемид	+
Баклофен и Акампросат и Торасемид	+
Сульфисоксазол и Триметазидин и Торасемид и Зонисамид	+
Сульфисоксазол и Мексилетин и Торасемид и Цинакальцет	+
Баклофен и Акампросат и Торасемид и Дигитилкарбамазин	+
Баклофен и Акампросат и Торасемид и Дигитилкарбамазин и Ифенпродил	+
Левосимендан и Баклофен и Триметазидин	+
Левосимендан и Аминокапроевая кислота и Триметазидин	+
Левосимендан и Тербинафин и Триметазидин	+
Левосимендан и Сульфисоксазол и	+
Триметазидин.	

Приведенные в качестве примеров на фиг. 7-12, 15-22 следующие комбинации лекарственных средств дают особенно интересные защитные эффекты против токсичности человеческого пептида  $A\beta_{1-42}$  в интоксикации клеток НВМЕС:

Акампросат и Ифенпродил,  
 Баклофен и Мексилетин,  
 Баклофен и Торасемид,  
 Баклофен и Триметазидин,  
 Цинакальцет и Мексилетин,  
 Циннаризин и Триметазидин,  
 Триметазидин и Зонисамид,  
 Мексилетин и Ифенпродил,  
 Моксифлоксацин и Баклофен,  
 Моксифлоксацин и Цинакальцет,  
 Моксифлоксацин и Триметазидин,  
 Моксифлоксацин и Сульфисоксазол,  
 Моксифлоксацин и Зонисамид или  
 Торасемид и Сульфисоксазол.

### 1.3. Защита роста нейритов от токсичности $A\beta_{1-42}$ .

Тестовые соединения и обработка  $A\beta_{1-42}$ .

Первичные крысиные кортикальные нейроны культивировали, как описано ранее. После 10 дней в культуре клетки инкубировали с лекарственными средствами. Через 1 ч клетки интоксцировали 2,5 мкМ бета-амилоидом (1-42; Bachem) в определенной среде без BDNF, но вместе с лекарственными средствами. Кортикальные нейроны интоксцировали в течение 24 ч. BDNF (10 нг/мл) использовали в качестве положительного (нейропротективного) контроля. На состояние были получены по три отдельные культуры, 6 лунок на состояние.

Длина нейритов.

После 24 ч интоксикации надосадочную жидкость отделяли и кортикальные нейроны фиксировали холодным раствором этанола (95%) и уксусной кислоты (5%) в течение 5 мин. После пермеабиллизации 0,1% сапонином клетки блокировали в течение 2 ч с помощью PBS, содержащего 1% фетальную телячью сыворотку. Затем клетки инкубировали с моноклональным антителом против второго белка, ассоциированного с микротрубочками (microtubule-associated-protein 2, MAP-2; Sigma). Это антитело выявляли с помощью козьего антитела против мышинных IgG, меченного Alexa Fluor 488 (Molecular probe). Ядра нейронов метили с помощью флуоресцентного маркера (Hoechst solution, SIGMA).

На лунку делали 10 снимков с помощью анализатора InCell Analyzer 1000™ (GE Healthcare) с 20× увеличением. Все снимки получали в одинаковых условиях. Анализ сети нейритов осуществляли с помощью программного обеспечения Developer (GE Healthcare) для оценки общей длины сети нейритов.

Результаты.

Комбинация баклофена и торасемида индуцирует значимый защитный эффект против токсичности человеческого пептида A $\beta$ <sub>1-42</sub> (увеличение сети нейритов на 531%) в первичных кортикальных нейрональных клетках, как показано на фиг. 23. Результаты ясно показывают, что интоксикация человеческим амилоидным пептидом (A $\beta$ <sub>1-42</sub> 2,5 мкМ) значимо предотвращается комбинацией и что, однако, комбинация усиливает сеть нейритов по сравнению с контролем.

Следовательно, данная комбинация позволяет эффективно защищать кортикальные нейрональные клетки и клетки нейрональной сети против токсичности человеческого пептида A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Более того, такое приращение сети нейритов подтверждает эффективность таких лекарственных средств в неврологических расстройствах, таких как поражение спинного мозга.

III. Соединения предотвращают токсичность человеческого A $\beta$ <sub>25-35</sub> *in vivo*.

Животные.

На всем протяжении исследования использовали самцов мышей Swiss. Животных размещали в пластиковых клетках со свободным доступом к лабораторному корму и воде, за исключением поведенческих экспериментов, и держали в регулируемой среде при 12 ч цикле чередования света и темноты (свет включался в 8 утра). Поведенческие эксперименты проводили в звуконепропускаемой экспериментальной комнате с регулируемой циркуляцией воздуха, к которой мышам давали привыкнуть, по меньшей мере в течение 30 мин перед каждым экспериментом.

Получение и инъекция амилоидного пептида

Пептид A $\beta$ <sub>25-35</sub> и скремблированный пептид A $\beta$ <sub>25-35</sub> растворяли в стерильной бидистиллированной воде, их хранили при -20°C до применения. Наблюдение с помощью световой микроскопии показало, что инкубирование пептида A $\beta$ <sub>25-35</sub>, но не скремблированного пептида A $\beta$ <sub>25-35</sub> приводит к появлению двух типов нерастворимых преципитатов, двоякопреломляющих фибрилл-подобных структур и аморфных шаровидных агрегатов.  $\beta$ -амилоидные пептиды затем вводили интрацеребровентрикулярно (i.c.v.). Вкратце, каждую мышь слегка анестезировали с помощью эфира, вставляли стальную иглу унилатерально в 1 мм справа от точки срединной линии, равноудаленной от каждого глаза, на равном расстоянии между глазами и ушами и перпендикулярно к плоскости черепа. Пептиды или носитель доставляли постепенно в течение примерно 3 с. Мыши демонстрируют нормальное поведение в пределах 1 мин после инъекции. Участок введения проверяли инъекцией индийских чернил в предварительных экспериментах. Ни вставка иглы, ни инъекция носителя не оказывали значимого влияния на выживание, поведенческие ответы и когнитивные функции.

Обработка лекарственным(ыми) соединением(ями).

В день 1, т.е. через 24 ч до инъекции пептида A $\beta$ <sub>25-35</sub>, лекарственные средства, комбинации лекарственных средств или раствор-носитель вводили перорально зондом дважды в день (в 8 утра и 6 вечера).

На 10 день (в 10 утра) мышам инъекцировали i.c.v. пептид A $\beta$ <sub>25-35</sub> или скремблированный пептид A $\beta$ <sub>25-35</sub> (контроль) в конечном объеме 3 мкл (3 мМ).

Между днем 0 и днем 7 лекарственные средства, комбинация лекарственных средств или раствор-носитель вводили перорально зондом дважды в день (в 8 утра и 6 вечера). Одно животное группы получало донепезил (эталонное соединение, 1 мг/кг/день) перорально зондом, одной инъекцией (в 8 утра). Лекарственные средства солибилизировали в воде и готовили заново перед каждым зондовым введением.

На день 7 всех животных тестировали на эффективность спонтанного чередования в тесте с Y-образным лабиринтом, показателе пространственной рабочей памяти.

На день 7 или 8 контекстуальная долговременная память животных оценивалась с помощью процедуры пассивного избегания понижающего типа.

На 8 день мышей забивали. Их мозги подвергали диссекции и хранили при -80°C до последующего анализа.

Положительные результаты наблюдали в поведенческих активностях и биохимических тестах, осуществленных через 7 дней после i.c.v. инъекции пептида A $\beta$ <sub>25-35</sub>, а именно для комбинаций, перечисленных в табл. 5.

Таблица 5

Комбинация лекарственных средств	Результаты биохимических и/или поведенческих тестов
Баклофен и Торасемид	+
Мексилетин и Цинакальцет	+
Сульфисоксазол и Торасемид	+
Баклофен и Триметазидин и Торасемид	+
Баклофен и Цинакальцет и Торасемид	+
Баклофен и Акампросат и Торасемид	+
Сульфисоксазол и Триметазидин и Торасемид и Зонисамид	+
Сульфисоксазол и Мексилетин и Торасемид и Цинакальцет	+
Баклофен и Акампросат и Торасемид и Диэтилкарбамазин	+
Баклофен и Акампросат и Торасемид и Диэтилкарбамазин и Ифенпродил	+
Левосимендан и Баклофен и Триметазидин	+
Левосимендан и Аминокапроевая кислота и Триметазидин	+
Левосимендан и тербинафин и Триметазидин	+
Левосимендан и Сульфисоксазол и Триметазидин.	+

IV. Соединения усиливают поведенческие и когнитивные активности интоксцированных животных.

Животных интоксцировали, как указано в разделе выше.

Эффективность спонтанного чередования - Тест в Y-образном лабиринте.

На день 7 всех животных тестировали на эффективность спонтанного чередования в Y-образном лабиринте, показателе спонтанной рабочей памяти. Y-образный лабиринт сделан из серого поливинилхлорида. Каждое плечо имеет длину 40 см в длину, 13 см в высоту и 3 см в ширину внизу, 10 см в ширину вверху, и плечи сходятся в одной точке с равным углом. Каждую мышь помещали в конце одного плеча и позволяли свободно передвигаться по лабиринту в течение 8-минутной сессии. Серии входов в плечи, включая возможные возвращения в одно и то же плечо, проверяли визуально. Чередование определяется как входы во все три плеча в каждый последующий случай входа. Количество максимальных чередований, следовательно, является общим числом вхождений в плечи, минус два, а процент чередования рассчитывается как (фактические чередования/максимальные чередования)×100. Параметры включают процент чередования (показатель памяти) и общее количество входов в плечи (показатель исследования). Животные, которые демонстрировали экстремальное поведение (процент альтернации <25% или >85% или количество входов в "плечи" лабиринта <10), отбраковывались. Как правило, отбраковка составляла 0-5% животных. Этот тест, в частности, служит для анализа вклада поведенческого уровня и амнезического эффекта, индуцированного в мышах с помощью инъекции Aβ<sub>25-35</sub>.

Тест условного рефлекса пассивного избегания.

Устройство является двухкамерным (15×20×15 см в высоту) коробкой с одной камерой, освещаемой белыми поливинилхлоридными стенками, и с другой камерой, затемненной черным поливинилхлоридными стенками и сетчатым полом. Дверь-гильотина отделяет камеры. 60-ваттная лампа, расположенная в 40 см, над устройством освещает белую камеру в ходе эксперимента. Рандомизированные электроболевые раздражения лап животных (0,3 мА в течение 3 с) могут быть осуществлены на сетчатом полу с помощью генератора шока с перемешивателем (Lafayette Instruments, Лафайетт, США). Подъемная дверь изначально закрыта в ходе тренировочной сессии. Каждую мышь помещали в белую камеру. Через 5 с дверь поднималась. Когда мышь входила в затемненную камеру и помещала все свои лапы на сетчатый пол, дверь закрывалась и в течение 3 с осуществлялось электроболевое раздражение. Пошаговую задержку, т.е. задержку, потраченную на вход в затемненную камеру, и количество вокализаций, записывали. Тест удерживания проводили через 24 ч после тренировки. Каждую мышь опять помещали в белую камеру. Через 5 с дверь поднимали, пошаговую задержку и задержку бегства, т.е. время, потраченное на возвращение в белую камеру, записывали вплоть до 300 с.

Положительные результаты наблюдали для каждой из протестированных комбинаций, перечисленных в табл. 6.

Таблица 6

Комбинация лекарственных средств	Тест в Y-образном лабиринте	Пассивное избегание	
		Задержка бегства	Пошаговая задержка
Баклофен-торасемид	+	+	+
Баклофен-Акампросат-Торасемид	+	+	+
Мексилетин и Цанакальцет	+	+	+
Сульфисоксазол и Торасемид	+	+	+

V. Соединения изобретения улучшают нейрофизиологическое понимание неврологических заболеваний.

Комбинированные терапии тестировались в *in vivo* модели интоксикации А $\beta$ . Оценивали их влияние на некоторые параметры, которые затронуты в неврологических заболеваниях:

уровень экспрессии каспаз 3 и 9, рассматриваемый как индикатор апоптоза, перекисное окисление липидов, рассматриваемое как маркер уровня окислительного стресса, тест экспрессии GFAP, рассматриваемой как маркер уровня воспаления в мозге, целостность гематоэнцефалического барьера, общая целостность синапсов (тИФА на синаптофизин).

Целостность гематоэнцефалического барьера.

Экспериментальный дизайн интоксикации животных с помощью А $\beta$  был таким же, что и в части III.

Потенциальный защитный эффект комбинированных терапий на целостность гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) анализировали в мышцах, инъецированных интречеребровентрикулярно (*i.c.v.*) олигомерным амилоид- $\beta_{25-35}$  пептидом (А $\beta_{25-35}$ ) или скремблированным А $\beta_{25-35}$  контрольным пептидом (Sc.А $\beta$ ), через 7 дней после инъекции.

На день 7 после инъекции А $\beta_{25-35}$  животным тестировали с помощью способа с ЕВ (Evans Blue) целостность ГЭБ. Известно, что краситель ЕВ связывается с сывороточным альбумином после периферической инъекции и используется в качестве средства отслеживания сывороточного альбумина.

Краситель ЕВ (2% в солевом растворе, 4 мл/кг) инъецировали внутривентрикулярно (в.б.) за 3 ч перед транскардиальной перфузией. Мышей анестезировали с помощью в.б. 200 мкл предварительной смеси кетамина 80 мг/кг, ксилазина 10 мг/кг, вскрывали грудную клетку. Мышей перфузировали транскардиально с помощью 250 мл солевого раствора в течение примерно 15 мин до тех пор, пока жидкость из правого предсердия не становилась бесцветной. После декапитации мозг удаляли и подвергали диссекции в трех областях: кора головного мозга (левая + правая), гиппокамп (левый + правый), диэнцефалон. Затем каждую область мозга взвешивали для количественного измерения экстравазации ЕВ-альбумина.

Образцы гомогенизировали в фосфатно-солевом буферном растворе и смешивали на вортексе после добавления 60% трихлоруксусной кислоты для осаждения белка. Образцы охлаждали при 4°C, затем центрифугировали 30 мин при 10000 $\times$ g, 4°C. Надосадочную жидкость измеряли при 610 нм для поглощения ЕВ с помощью спектрофотометра.

ЕВ количественно оценивали как

мкг/кг ткани мозга с помощью стандартной кривой, полученной с помощью известной концентрации ЕВ-альбумина;

мкг/кг белка.

Как упомянуто в табл. 7, комбинированные терапии изобретения эффективны в поддержании целостности ГЭБ по сравнению с необработанными интоксигированными животными.

Общая целостность синапсов (тИФА на синаптофизин).

Синаптофизин был выбран как маркер целостности синапсов и тестировался с помощью коммерческого набора тИФА (USCN, Ref. E90425Mu). Образцы получали из тканей гиппокампуса и гомогенизировали в экстракционном буфере, как описано изготовителем и в соответствующей литературе.

Ткани промывали ледяным PBS (0,02 моль/л, pH 7,0-7,2) для полного удаления избытка крови и взвешивали перед замораживанием в азоте и хранении при -80°C. Ткани разрезали на малые куски и гомогенизировали в 1 мл ледяном фосфатно-солевом буфере (PBS) с помощью стеклянного гомогенизатора. Полученную суспензию обрабатывали звуком с помощью ультразвукового клеточного дезинтегратора в ходе двух циклов замораживания-оттаивания для дальнейшего разрушения клеточных мембран. Затем гомогенаты центрифугировали в течение 5 мин при 5000 $\times$ g и надосадочную жидкость оценивали незамедлительно.

Все образцы тестировали в трех повторах.

Количественную оценку белков осуществляли с помощью набора для определения количества белка с ВСА (бицинхониновой кислотой) Pierce (Pierce, Ref. #23221) для оценки эффективности экстракции и осуществления нормализации.

Общие концентрации белка затем рассчитывали из разведений стандартной кривой и использовали для нормализации результатов тИФА.

Результаты (табл. 7) демонстрируют, что комбинированные терапии являются эффективными в поддержании общего уровня синаптофизина в мозге обработанных животных по сравнению с необработанными интоксигированными животными.

Тест окислительного стресса.

Мышей умерщвляли декапитацией и оба гиппокампа быстро удаляли, взвешивали и хранили в жидком азоте до тестирования. После разморозки гиппокампа гомогенизировали в холодном метаноле (1/10 мас./об.) центрифугировали при 1000×g в течение 5 мин и надосадочную жидкость, помещали в пробирку Эппендорфа. Реакционный объем каждого гомогената добавляли к 1 мМ FeSO<sub>4</sub>, 0,25 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 мМ ксиленолового оранжевого и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. После считывания при 580 нм (A580 1), 10 мкл 1 мМ кумол гидропероксида (СНР) добавляли к образцу и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре для определения максимального уровня окисления. Поглощение измеряли при длине волны 540 нм. Уровень липидного перекисного окисления определяется как эквиваленты СНР (СНРЕ) согласно СНРЕ=A580 1/A580 2×[СНР], и выражали в виде эквивалентов СНР на массу ткани и как процент данных контрольной группы.

Результаты (табл. 7) показывают, что комбинированные терапии являются эффективными в снижении общего окислительного стресса, индуцированного Аβ в мозге обработанных животных, по сравнению с необработанными интоксигированными животными.

Тест индукции каспазного пути и тест экспрессии GFAP.

Мышей умерщвляли декапитацией и оба гиппокампа быстро удаляли, промывали в ледяном PBS (0,02 моль/л, рН 7,0-7,2) для полного удаления избытка крови, взвешивали и хранили в жидком азоте до тестирования. Ткани разрезали на малые куски и гомогенизировали в 1 мл ледяном PBS с помощью стеклянного гомогенизатора. Полученную суспензию обрабатывали звуком с помощью ультразвукового клеточного дезинтегратора в ходе двух циклов замораживания-оттаивания для дальнейшего разрушения клеточных мембран. Затем гомогенаты центрифугировали при 5000×g в течение 5 мин и надосадочную жидкость оценивали незамедлительно.

Эксперименты проводили с помощью коммерческого теста Каспаза-3 (USCN - E90626Mu), Каспаза-9 (USCN - E90627Mu), GFAP (USCN - E90068).

Количественную оценку белков осуществляли с помощью набора для определения количества белка с ВСА (бицинониновой кислотой) Pierce (Pierce, Ref. #23221) для оценки эффективности экстракции и осуществления нормализации.

Результаты (табл. 7) демонстрируют, что комбинированные терапии оказывают положительное воздействие на маркеры апоптоза и воспаления в мозге обработанных животных по сравнению с необработанными интоксигированными животными.

Таблица 7

Комбинация лекарственных средств	Каспазный путь	Окислительный стресс	Экспрессия GFAP	Целостность ГЭБ	Общая целостность синапсов
Баклофен-Торасемид	+	+	+	+	+
Баклофен-Акампросат-Торасемид	+	+	+	+	+
Мексилетин и Цанакальцет	+	+	+	+	+
Сульфисоксазол и Торасемид	+	+	+	+	+

В) Предотвращение токсичности глутамата на нейронах.

В этой дополнительной серии экспериментов соединения-кандидаты тестировали по их способности предотвращать или редуцировать токсичные эффекты глутаматной токсичности на нейрональные клетки. Глутаматная токсичность вовлечена в патогенез неврологических заболеваний или расстройств, таких как рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, невропатии, алкоголизм или алкогольная абстиненция или поражение спинного мозга. Лекарственные средства вначале тестировались индивидуально, а затем проводились тесты на их комбинированное действие.

Способы.

Эффективность комбинаций лекарственных средств изобретения оценивали на первичных кортикальных нейрональных клетках. Протокол, который используется в этих тестах, является таким же, как и описанный в разделе А.1.2.

Тесты токсичности глутамата.

Нейропротективный эффект соединений оценивали путем количественной оценки нейритной сети (окрашивание нейрофиламентов (NF)), которая специфически выявляет глутаматэргические нейроны.

Через 12 дней культуры нейронов лекарственные средства кандидатных комбинаций растворяли в культуральной среде (+0,1% ДМСО). Кандидатные комбинации затем предварительно инкубировали с

нейронами в течение 1 ч до поражения глутаматом. Через 1 ч инкубации глутамат добавляли в течение 20 мин, до конечной концентрации 40 мкМ, в присутствии кандидатных комбинаций для того, чтобы избежать дальнейшего разведения лекарственных средств. В конце инкубации среду заменяли на среду с кандидатной комбинацией, но без глутамата. Культуру фиксировали через 24 ч после поражения глутаматом. МК801 (Дизоциллин малеат, 77086-22-7 - 20 мкМ) использовали в качестве положительного контроля.

После пермеабиллизации сапонином (Sigma) клетки блокировали в течение 2 ч с помощью PBS, содержащего 10% козьей сыворотки, затем клетки инкубировали с помощью мышиного моноклонального первичного антитела против антитела к нейрофиламентам (NF, Sigma). Это антитело выявляли с помощью козьего антитела против мышиных IgG, конъюгированного с Alexa Fluor 488.

Ядра клеток метили с помощью флуоресцентного маркера (Hoechst solution, SIGMA) и оценивали количественно сеть нейритов. По шесть лунок на состоянии использовали для оценки нейронального выживания в трех различных культурах.

Результаты.

Все протестированные комбинации лекарственных средств дают защитный эффект против токсичности глутамата для кортикальных нейрональных клеток. Результаты показаны в табл. 8.

Как проиллюстрировано фиг. 24 и 25, комбинации по изобретению сильно защищают нейроны от глутаматной токсичности в экспериментальных условиях, описанных выше. Примечательно, что эффективная защита упоминается с помощью концентраций лекарственных средств, при которых лекарственные средства, использованные отдельно, не имели значимого или имели низкий защитный эффект.

Таблица 8

Комбинация лекарственных средств	Нейропротективный эффект против токсичности глутамата
Баклофен-Торасемид	+
Баклофен-Акампросат-Торасемид	+
Мексилетин и Цанакальцет	+
Сульфисоксазол и Торасемид	+

С) Улучшение при других расстройствах, связанных с эксайтотоксичностью глутамата, с помощью комбинаций изобретения.

Вышеупомнутый *in vitro* защитный эффект против токсичности глутамата лекарственных средств и комбинаций изобретения, в сочетании с защитными эффектами, проиллюстрированными в данном документе на нескольких моделях AD, побудили изобретателей проверить эти лекарственные средства в некоторых моделях других заболеваний, в патологию которых также вовлечена глутаматная токсичность, таких как MS, ALS и невропатическая боль.

1) Защитный эффект комбинаций в *in vivo* модели рассеянного склероза

Модель, в которой у миелин-олигодендроцит гликопротеин-иммунизированных (MOG-иммунизированных) мышей развивается хронический прогрессирующий EAE, использовалась для демонстрации благоприятного эффекта композиций изобретения при лечении рассеянного склероза.

Животные и химические вещества.

Мыши-самки C57BL/6J (8-ми недельные) были приобретены у Janvier (Франция); после двух недель адаптации у самок мышей (10-недельные) развивается хронический паралич после иммунизации пептидом MOG (миелин-олигодендроцит гликопротеин). Экспериментальный энцефаломиелит индуцируется с помощью набора Hooke Kit MOG35-55/CFA Emulsion PTX (коклюшный токсин) для индукции EAE (ЕК-0110, ЕК-0115; Hooke laboratories). Контрольным набором является СК-0115 (Hooke laboratories).

Порядок проведения эксперимента.

Экспериментальный энцефаломиелит индуцировали следующей процедурой.

В день 0 осуществляли две подкожные инъекции по 0,1 мл каждой; одну в верхнюю часть спины мыши, а другую - в нижнюю часть спины. Каждая инъекция содержит 100 мкг пептида MOG35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK), 200 мкг инактивированного *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra эмульгированных в полном адьюванте Фрейнда (CFA) (Hooke laboratories). Эмульсия обеспечивает антиген, необходимый для распространения и дифференцировки MOG-специфичных аутоиммунных Т-клеток.

Две внутрибрюшинных инъекции 500 нг коклюшного токсина в PBS (набор Hooke) осуществляли через 2 ч (день 0) и 24 ч (день 1) после инъекции MOG. Коклюшный токсин усиливает развитие EAE путем обеспечения дополнительного адьюванта.

У мышей через 8 дней после иммунизации развивается EAE и остаются хронически парализованными в течение эксперимента. После иммунизации мышей ежедневно наблюдали на предмет клинических симптомов в слепой процедуре. Животных держали в обычном беспатогенном техническом блоке, и все эксперименты проводили в соответствии с руководствами, описанными или разрешенными официальным местным комитетом по биоэтике.

Экспериментальные группы и обработка лекарственным средством.

Группы самок мышей, как описано, гомогенизировали по массе перед иммунизацией:

контрольная группа: инъекция носителя в тех же условиях мышам с ЕАЕ (с дня 1 по день 28, плацебо давали ежедневно);

группа ЕАЕ: инъекция MOG (день 0) + инъекции коклюшного токсина (день 0 и 1) - с дня -1 по день 28, плацебо дается перорально ежедневно;

ЕАЕ + положительный контроль: инъекция MOG (день 0) + инъекции коклюшного токсина (день 0 и 1) - с дня -1 по день 28, дексаметазон давали перорально ежедневно.

ЕАЕ + группа лечения: инъекция MOG (День 0) + инъекции коклюшного токсина (день 0 и 1). Обработки начинаются за день перед иммунизацией и заканчиваются до дня 28.

Клинические баллы измеряли в дни 0-5-8-9-12-14-16-19-21-23-26-28.

Повсеместно использовали программное обеспечение Statistica (Statsoft Inc.) для статистического анализа. Дисперсионный анализ и тест Стьюдента использовали для анализа клинического балла заболевания.  $P < 0,05$  рассматривали как значимое.

Задержки возникновения заболевания, клинический балл и задержку смерти сравнивали между каждой группой с эталонной "immu" группой с помощью кривых Каплана-Мейера и модели Кокса (пакет R "выживание"). Полученные р-значения являются односторонними и тест гипотезы на улучшение по сравнению с эталонной "immu" группой.

Общий клинический балл состоит из балла хвоста, балла задних конечностей, балла передних конечностей и балла мочевого пузыря, как описано ниже.

Балл хвоста:

Балл=0	Нормальная мышь удерживает свой хвост поднятым при движении.
Балл=1	Если край хвоста отвисает с тенденцией к падению.
Балл=2	Если хвост полностью отвисает и падает на стол.

Балл задней конечности:

Балл=0	Нормальная мышь имеет энергичную походку и не волочит свои лапы
Балл=1	Любой из следующих тестов является положительным: А – Тест на переворачивание: при удерживании хвоста между большим и указательным пальцами, перевернуть животное на его спину и наблюдать время, которое займет у животного для того, чтобы перевернуть себя. Здоровая мышь будет переворачиваться немедленно. Задержка предполагает слабость задних конечностей. В – Поместить мышь на верхнюю сетку клетки и наблюдать, как она пересечет с одной стороны на другую. Если одна или обе конечности часто проскальзывают между планками, то считается, что имеется частичный паралич.
Балл=2	Оба предыдущих теста являются положительными.
Балл=3	Одна или обе задние конечности демонстрируют признаки паралича, но некоторые движения сохраняются, например: животное может хвататься и удерживаться на нижней стороне верхней сетки клетки в течение короткого времени, перед тем, как отпустить.
Балл=4	Когда обе задние ноги парализованы и мышь тащит их при движении.

Балл передних конечностей:

Балл=0	Нормальные мыши используют свои передние лапы для захвата и движения и удержания своей головы поднятой.
Балл=1	Движение является возможным, но трудным из-за слабости в одной или обеих лапах, например, передние лапы считаются слабыми, когда мышь имеет трудности с ухватыванием на нижней стороне верхней сетки клетки. Другим признаком слабости является опускание головы
Балл=2	Когда одна передняя конечность парализована (невозможность хвататься за что-либо и мышь поворачивается вокруг парализованной конечности). В это время голова теряет большую часть своего мышечного тонуса.
Балл=3	Мышь не может двигаться, а пища и вода недостижимы.

Балл мочевого пузыря:

Балл=0	Нормальная мышь полностью контролирует свой мочевой пузырь.
Балл=1	Считается, что мышь страдает недержанием, если ее нижняя часть тела пропитана мочой.

Общий балл для каждого животного определяли сложением всех вышеуказанных категорий. Максимальный балл для живых животных равнялся 10.

Результаты - Комбинированные терапии эффективны в модели MS.

Значимое улучшение глобального клинического балла наблюдается у мышей "группы обработки ЕАЕ+", а именно для комбинаций, перечисленных в табл. 9.

Таблица 9

Комбинация лекарственных средств	Улучшение общего клинического балла у ЕАЕ-животных
Баклофен-Торасемид	+
Баклофен-Акампросат-Торасемид	+
Мексилетин и Цанакальцет	+
Сульфисоксазол и Торасемид	+

## II. Защитный эффект комбинаций в модели ALS.

Комбинированные терапии согласно настоящему изобретению протестированы *in vitro*, в модели совместно культивирования, и *in vivo*, в мышинной модели ALS. Протоколы и результаты представлены в данном разделе.

II.1 Защитный эффект против токсичности глутамата в первичных культурах нервно-мышечной совместной культуры.

Первичные совместные культуры нервных и мышечных клеток.

Человеческую мышцу получали согласно ранее описанному способу из части биопсий здорового пациента (44). Мышечные клетки получали из диссоциированных клеток (10000 клеток/луноку), засеивали на покрытых желатином 0,1% на 48-луночном планшете и растили на пролиферирующей среде, включающей смесь среды MEM и среды M199.

Сразу после слияния DRG необходимы для достижения хорошего соотношения иннервации. Иннервированные культуры поддерживали в смешанной среде. Через 24 ч при обычном совместном культивировании нейритов наблюдали рост эксплантов спинного мозга. Они могут контактировать с мышечными трубками и индуцируют первые сокращения через 8 дней. Сразу после этого иннервированные мышечные волокна расположены в непосредственной близости от эксплантов спинного мозга и практически непрерывно сокращаются. Иннервированные волокна морфологически пространственно отличаются от неиннервируемых волокон и могут быть легко отличены от последних.

Завершено одно совместное культивирование (6 лунок на состоянии).

Поражение глутаматом.

На день 27 совместные культуры инкубировали с соединениями-кандидатами или рилузолем за 1 ч перед интоксикацией глутаматом (60 мкМ) в течение 20 мин. Затем совместные культуры промывали и соединения-кандидаты или рилузол добавляли в течение дополнительных 48 ч. После этого времени инкубации нефиксированные совместные культуры инкубировали с  $\alpha$ -бунгаротоксином, соединенным с Alexa 488, в концентрации 500 нмоль/л в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем совместные культуры фиксировали PFA в течение 20 мин при комнатной температуре.

После пермеабилзации 0,1% сапонином совместные культуры инкубировали с антителом против нейрофиламентов (NF).

Эти антитела определяются с помощью Alexa Fluor 568 козьего антитела против мышечных IgG (Molecular probe). Ядра нейронов помечены флуоресцентным маркером (Hoechst solution).

Конечными точками являются (1) общая длина нейритов, (2) количество моторных единиц, (3) общая площадь моторных единиц, которая является показательной для выживания и функциональности мотонейронов.

Для каждого состояния делали  $2 \times 10$  снимков с помощью анализатора InCell Analyzer 1000™ (GE Healthcare) с  $20\times$  увеличением. Все изображения получали в одинаковых условиях.

Результаты.

Лекарственные средства изобретения эффективно защищают мотонейроны и моторные единицы в модели совместного культивирования.

Таблица 10

Комбинация лекарственных средств	Защитный эффект против интоксикации глутаматом в совместных мышечных/нервных культурах
Баклофен-Торасемид	+
Баклофен-Акампросат-Торасемид	+
Мексилетин и Цанакальцет	+
Сульфисоксазол и Торасемид	+

## II.2. Комбинированные терапии эффективны в мышинной модели ALS.

Эксперименты проводили на самцах мышей. Самцов трансгенных мышей B6SJL-Tg(SOD1)<sup>2Gur/J</sup> и их контроль (соответственно SN2726 и SN2297, из Jackson Laboratories, Бен-Харбор, США, дистрибуцией которых во Франции занимается Charles River) были выбраны для этого набора экспериментов для имитации ALS.

Больные мыши экспрессируют трансген SOD1-G93A, сконструированный из мутантного человеческого гена SOD1 (одиночная аминокислотная замена глицина на аланин в кодоне 93), управляемого с помощью своего эндогенного человеческого промотора SOD1. Контрольные мыши экспрессируют кон-

трольный человеческий ген SOD1.

Введение лекарственного средства.

Мышам вводили дозы лекарственных кандидатов, разведенных в носителе с 60 дня после рождения и до смерти. Разбавленные растворы лекарственных кандидатов получали с помощью воды при комнатной температуре сразу перед началом введения.

В питьевой воде:

рилузол добавляли в питьевую воду в конечной концентрации 6 мг/мл (корректировали к средней массе тела каждой группы) в 5% циклодекстрине. Поскольку мыши выпивали около 5 мл/день, оцениваемая вводимая доза составляет 30 мг/кг/день, которая является дозой, которая, как было показано, увеличивает выживаемость мышей;

циклодекстрин использовали в качестве носителя в конечной концентрации 5%, разведенный водой при комнатной температуре из стокового раствора (циклодекстрин 20%).

Пероральное введение (через рот):

комбинации лекарственных средств вводили перорально ежедневно;

циклодекстрин использовали в качестве носителя в конечной концентрации 5%, разведенный водой при комнатной температуре из стокового раствора (циклодекстрин 20%).

Клиническое наблюдение.

Клиническое наблюдение для каждой мыши проводили ежедневно, с первого дня обработки (60-дневный возраст) до смерти (или умерщвления).

Клиническое наблюдение включает изучение поведенческих тестов: начало паралича, "потеря при разведении", "потеря рефлекса переворачивания" и общее наблюдение за походкой:

возникновение паралича: наблюдение включает наблюдение паралича в каждой конечности. Возникновение паралича соответствует дню первых признаков паралича;

тест потери при разведении задних конечностей включает регистрацию тремора или подрагивания и положения задних конечностей (свисание или перекашивание), когда мыши удерживаются за хвост;

в тесте потери рефлекса переворачивания оценивали способность мышей переворачивать себя в течение 30 с при повороте в любую сторону. Рефлекс потери переворачивания утрачен, когда мышь не способна перевернуть себя. Потеря рефлекса переворачивания определяется в конечной стадии заболевания: мыши, не способные перевернуть себя, подвергаются эвтаназии.

Результаты - Комбинированные терапии эффективны в *in vivo* модели ALS.

Улучшение заболевания наблюдается у больных животных, обработанных с помощью лекарственных средств и комбинаций лекарственных средств изобретения.

Примечательно, что комбинации лекарственных средств, перечисленные в табл. 11, эффективно улучшают клинический балл этих животных в ходе различных стадий заболевания.

Таблица 11

Комбинация лекарственных средств	Влияние на клинический балл у больных животных
Баклофен-Торасемид	+
Баклофен-Акампросат-Торасемид	+
Мексилетин и Цанакальцет	+
Сульфисоксазол и Торасемид	+

III) Защитный эффект комбинаций изобретения в индуцированной оксалиплатином невропатии, как *in vivo* модели невропатической боли.

Комбинированные терапии настоящего изобретения протестированы *in vivo*, в подходящей модели периферической невропатии, т.е. острой модели оксалиплатин-индуцированной невропатии и хронической модели оксалиплатин-индуцированной невропатии. Животные, протоколы и результаты представлены в данном разделе.

Содержание животных.

Использовали крыс Спрага-Дуоли (CERJ, Франция) массой 150-175 г в начале экспериментов обработки оксалиплатином (D<sub>0</sub>). Животных размещали в техническом блоке для работы с животными с ограниченным доступом в комнату с контролируемой температурой (19,5-24,5°C) и относительной влажностью (19,5-24,5°C) при 12-часовом цикле смена света/темноты, с неограниченным доступом к стандартному гранулированному лабораторному корму и воде в течение всего исследования. Животных разместили по 4 или 5 на клетку и в течение однонедельного периода акклиматизации наблюдали перед каким-либо тестированием.

План эксперимента.

Четыре следующие группы крыс использовали во всех экспериментах.

Контрольные группы:

Группа 1: Носитель оксалиплатина (дистиллированная вода), в.б./носитель кандидатной(ых) комбинации(й) (дистиллированная вода), п.о. ежедневно.

Группа 2: Оксалиплатин (дистиллированная вода), в.б./носитель кандидатной(ых) комбинации(й) (дистиллированная вода), п.о. ежедневно.

Группа 3: Оксалиплатин 3 мг/кг в.б./одиночное лекарственное средство в дистиллированной воде, п.о. ежедневно × 9.

Протестированная композиция группы:

Группа 4: Оксалиплатин 3 мг/кг в.б./кандидатная(ые) комбинация(и) в дистиллированной воде, п.о. ежедневно × 9.

Группа 5: Оксалиплатин 3 мг/кг в.б./габапентин (100 мг/кг) в дистиллированной воде, перорально в дни тестирования (т.е. D1 и D8).

Носитель и тестируемые единицы доставляли ежедневно с D-1 по D7 (за день до последнего дня тестирования), тогда как габапентин вводили в дни тестирования (за 120 мин перед тестом).

Все обработки проводили в закодированном и случайном порядке, когда это возможно. Дозы выражены по показателю свободного активного вещества.

Индукция невропатии.

Острую невропатию индуцировали одиночной внутрибрюшинной инъекцией оксалиплатина (3 мг/кг).

Хроническую периферическую невропатию индуцировали повторными внутрибрюшинными инъекциями оксалиплатина (3 мг/кг, в.б.) в дни 0, 2, 4 и 7 (CD=12 мг/кг, в.б.). Хроническая невропатия у людей является кумулятивной, а также наиболее часто встречается у пациентов, которые получали общие дозы оксалиплатина, большие или равные 540 мг/м<sup>2</sup>, которые соответствуют ~15 мг/кг в виде кумулятивной дозы у крыс (Cersosimo R.J. 2005).

Оксалиплатин-индуцированная болезненная невропатия у крыс воспроизводит болевые симптомы у пациентов, подвергнутых лечению оксалиплатином:

термическая гипералгезия является наиболее ранним симптомом. Ее можно измерить с помощью ацетонового теста или с помощью теста с погружением хвоста;

механическая гипералгезия появляется позже. Она может быть количественно оценена с помощью теста фон Фрея или теста давления на лапу.

Дозирование и тестирование животных.

Все комбинации лекарственных средств вводили со дня перед первой внутрибрюшинной инъекцией оксалиплатина 3 мг/мл (D-1) и продолжали вводить перорально до D7. В течение дней тестирования (т.е. D1 и D7), комбинации лекарственных средств вводили после теста. Животным из группы, обработанной эталоном (габапентин), введения осуществлялись только в дни тестирования.

Ацетоновый тест.

Холодовую аллодинию оценивали с помощью ацетонового теста путем измерения ответов на термическую неболевую стимуляцию в D1 (около 24 ч после первой инъекции оксалиплатина 3 мг/кг (острый эффект оксалиплатина) и D8 (хронический эффект оксалиплатина).

В ацетоновом тесте задержка отдергивания задней лапы измеряется после нанесения капли ацетона на плантарную поверхность обеих задних лап (время реакции) и подсчитывается интенсивность ответа (холодный балл). Время реакции на эффект охлаждения ацетона измеряется в пределах 20 с (время отсечки) после нанесения ацетона. Ответы на ацетон также градуируются по следующей 4-пунктовой шкале: 0 (нет ответа); 1 (быстрое одергивание, рывок лапы); 2 (продолжительное одергивание или заметный рывок лапы); 3 (повторный рывок лапы с облизыванием или кусанием).

Для каждой экспериментальной группы результаты выражены как время реакции определяется как время, выраженное в секундах, требуемое для выявления реакции лапы (среднее шести измерений для каждой крысы вместе с ± SEM);

кумулятивный холодовой балл, определенный как сумма 6 баллов для каждой крысы вместе ± SEM. Минимальный балл, составляющий 0 (нет ответа на любое из шести испытаний), а максимальный возможный балл составляет 18 (повторный рывок и лизание или кусание лап, в каждом из шести испытаний).

Статистический анализ.

Осуществляли тест Стьюдента, односторонний, 3 типа. Значимый уровень установили как  $p < 0,05$ ; все группы сравнивали с группой заболевание+носитель (группа, обработанная оксалиплатином). Средние и среднеквадратическая ошибка середина показаны на фигурах.

Результаты.

Оксалиплатин индуцирует значимое снижение времени реакции отдергивания лапы после нанесения ацетона (больная группа + носитель) в зависимости от времени. Это снижение является прогрессивным и значимым со дня 1 (острая модель невропатии, индуцированной оксалиплатином) по день 8 (хроническая модель) по сравнению с группой, получавшей носитель.

Анти-аллодинический эффект в острой модели оксалиплатин-индуцированной невропатии.

Комбинации лекарственных средств, протестированных в острой модели оксалиплатин-индуцированной невропатии, оценивали с помощью ацетонового теста. В табл. 12 представлены комбинации лекарственных средств (группа 4), которые индуцируют значимое снижение в кумулятивном хо-

лодном балле и значимое снижение времени реакции по сравнению с группой, обработанной оксалиплатиной-носителем (группа 2). В заключение необходимо отметить, что эти лекарственные комбинации защищают животных от острой невропатии, индуцированной оксалиплатином.

Таблица 12

Комбинации лекарственных средств в модели острой невропатии (Группа 4)	Вариация холодного балла по сравнению с Группой 2	Время реакции по сравнению с группой 2	Антиаллодинический эффект
Баклофен-Торасемид	Уменьшение	увеличение	+
Баклофен-Акампросат-Торасемид	уменьшение	увеличение	+
Мексилетин и цанакальцет	уменьшение	увеличение	+
Сульфисоксазол и торасемид	уменьшение	увеличение	+

+ Анти-аллодинический эффект, полученный в группе 3 крыс, после анализа кумулятивных холодных баллов и анализа времени реакции в ацетоновых тестах, в острой модели, индуцированной оксалиплатином.

Анти-аллодинический эффект в хронической модели оксалиплатин-индуцированной невропатии.

Комбинации лекарственных средств, используемых в хронической модели оксалиплатин-индуцированной невропатии, оценивали с помощью ацетонового теста.

В табл. 13 представлены комбинации лекарственных средств, для которых время реакции и холодный балл в ацетоновом тесте, измеренный в группе 4 (животные, обработанные с помощью комбинаций лекарственных средств и оксалиплатина), соответственно значимо повышаются и снижаются после обработки в модели хронической невропатии по сравнению с группой, обработанной оксалиплатином-носителем (группа 2). В заключение необходимо отметить, что эти лекарственные комбинации защищают животных от хронической невропатии, индуцированной оксалиплатином.

Таблица 13

Комбинации лекарственных средств, протестированных в хронической модели невропатии (Группа 4)	Вариация холодного балла по сравнению с Группой 2	Время реакции по сравнению с группой 2	Антиаллодинический эффект
Баклофен-торасемид	уменьшение	увеличение	+
баклофен-акампросат-торасемид	уменьшение	увеличение	+
Мексилетин и цанакальцет	уменьшение	увеличение	+
Сульфисоксазол и торасемид	уменьшение	увеличение	+

+ Анти-аллодинический эффект, полученный в группе 3 крыс, после анализа кумулятивных холодных баллов и анализа времени реакции в ацетоновых тестах, в хронической модели, индуцированной оксалиплатином.

IV) Композиции на основе баклофена-торасемида стимулируют регенерацию нервов в неинтоксцированных клетках.

Нейротрофические эффекты комбинации баклофена-торасемида *in vitro*.

Тест длины нейритов.

Оценку роста нейритов в 10-дневных культурах крысиных кортикальных клеток осуществляли с помощью антител MAP-2, как упомянуто в разделе А) П.4, за исключением того, что клетки не экспонировались каким-либо токсичным веществам. 10-дневные клеточные культуры инкубировали с лекарственными средствами в течение 1 дня перед тестом.

Результаты.

Как показано на фиг. 28, комбинация баклофена-торасемида демонстрирует значимый нейротрофный эффект (+11%), тогда как индивидуальные лекарственные средства, при использовании отдельно, не оказывают какого-либо значимого нейротрофного эффекта. Действительно, значимое увеличение общей длины нейритов в пределах нейрональной сети (мечение MAP2-2) наблюдается при экспонировании комбинации баклофена-торасемида (400 и 80 нМ соответственно). Примечательно, что ни комбинация, ни лекарственные средства отдельно не оказывают влияния на количество нейронов, таким образом подчеркивая, что данное увеличение сети нейритов связано с удлинением существующих нейритов и стимуляцией *de novo* удлинений нейрональных клеток.

Эти результаты подтверждают, что комбинация баклофена-торасемида является эффективной в поддержании удлинения аксонов и, таким образом, эффективна при лечении поражения спинного мозга и других поражений нервов. Это подтверждает также, что комбинация эффективна при лечении насле-

двумя нейропатий, подтверждающих либо аксональный, либо демиелинизирующий, либо и аксональный, и демиелинизирующий компоненты. Действительно, следует считать, что демиелинизация вызывает дестабилизацию аксона, что приводит к дегенерации аксонов, наблюдаемой даже при невропатиях, считающихся в основном демиелинизирующей формой.

Композиции на основе баклофена-торасемида эффективны при активации регенерации нервов *in vivo*.

Сдавливание седалищного нерва широко принято в качестве валидной модели поражения периферического нерва и для оценки регенерации нервов. В данной модели повреждение нерва приводит к быстрому разрушению нервной функции, о чем свидетельствует мера вызванного потенциала мышечного действия (СМАР), генерируемого посредством стимуляции пораженного седалищного нерва.

Нервное поражение характеризуется более низкой проводимостью нервом сигнала, который приводит к увеличению задержки при образовании СМАР и нарушенной силой потенциала действия, что дает сниженную амплитуду и длительность.

Как правило, первые признаки восстановления нервной функции происходят в течение 2 недель и на 4 неделю после повреждения, значительная ремиелинизация регенерированных аксонов наблюдается в седалищном нерве с помощью гистологии (45).

Раздавливание нерва.

Мышей анестезировали изофлураном (2,5-3% в воздухе). Правое бедро затем брили и седалищный нерв экспонировали на уровне середины бедра и сдавливали в 5 мм проксимальнее бифуркации седалищного нерва. Нерв сдавливали в течение 10 с дважды с помощью микрозажимов (Holtex, reference P35311) с 90° поворотом между каждым сдавливанием. Для ложноперированных животных седалищные нервы экспонировали, но не раздавливали. Наконец, кожный разрез обеспечивали раневыми клипсами. День сдавливания рассматривается как день 0.

График дозирования.

День сдавливания, первое введение компонентов осуществляли через 30 мин после сдавливания.

Соединения затем вводили дважды в день, со дня после сдавливания и в течение 42 дней. В пределах одного дня введения лекарственных средств были разделены промежутком по меньшей мере 6 ч.

В тестовые дни (дни 7 и 30) мышам осуществляли введения за 1 ч 30 мин перед тестом.

Объем введения составлял 10 мл/кг, в 0,25% ДМСО/стерильной воде.

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

Измерения электромиографии.

Снятие электрофизиологических данных осуществляли с помощью электромиографа Keuroint (EMG) (Medtronic, Франция) на день 7 и день 30. Мышей анестезировали 2,5-3% изофлураном в воздухе. Подкожные монополярные игольчатые электроды использовали как для стимуляции, так и для записи. Супрамаксимальные (12,8 мА) прямоугольные импульсы длительностью 0,2 мс использовали для стимуляции седалищного нерва. Правый седалищный нерв (ипсилатеральный) стимулировали с помощью одиночного пульса, примененного к седалищной вырезке. СМАР записывали игольчатыми электродами, помещенными на икроножную мышцу. Начало (задержку) сигнала СМАР, выраженное в миллисекундах, использовали для оценки скорости проводимости нерва. Задержка, таким образом, отражает степень миелинизации аксонов. Также определяли амплитуду потенциала действия (мкВ), которая отражает уровень денервации и реинервации мышц. Амплитуда СМАР в настоящее время дается как пропорциональная количеству регенерированных моторных аксонов. Также была определена продолжительность вызванного мышечного потенциала. Амплитуда и продолжительность вызванного мышечного потенциала более связано с мышечной реинервацией. Задержка и амплитуда обычно признаются как наиболее важные конечные точки в случае нервной регенерации. Данные анализировали с помощью билатерального, 3 типа, t-критерия Стьюдента; значимый уровень установлен при  $p < 0,05$ .

Результаты.

Комбинации баклофена-торасемида являются эффективными во всех протестированных дозах, со значимо улучшенной временной задержкой сигнала по сравнению с животными, обработанными носителем, и это уже происходит на седьмой день после поражения нерва (фиг. 29А). Значимое различие все еще наблюдается на 30 день после сдавливания нерва, когда обычно наблюдается начало спонтанного восстановления.

Статистически значимое улучшение в амплитуде сигнала также наблюдается для дозы 3 на 30 день после сдавливания нерва (фиг. 29В). Такое улучшение также наблюдается, но в меньшей степени, для доз 1 и 2. Схожие результаты наблюдаются при измерении длительности сигнала.

В целом, эти *in vivo* результаты демонстрируют эффективность комбинации баклофена-торасемида при стимуляции нервной регенерации посредством ремиелинизации и мышечной реинервации. Поэтому *in vivo* экспериментальные данные подтверждают нейротрофические эффекты баклофена-торасемида, наблюдаемые *in vitro*, и их полезность при коррекции невропатий, когда нервы периферической нервной

системы являются поврежденными (т.е. невропатий, определенных в описании), но также при поражении спинного мозга.

#### Список литературы

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 antigliutamate, 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.
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).
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.
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.)
44. Braun S, Croizat 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.
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.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение комбинации, содержащей торасемид и баклофен или их соли, для усиления регенерации нервов или нейронов у субъекта, страдающего от повреждения нерва, выбранного из невротаксии, аксонотмезиса, невротмезиса, невропатии, вызванной прямым физическим инсультом нерва, или от болезни Шарко-Мари-Тута.

2. Применение по п.1, при котором комбинация дополнительно содержит по меньшей мере одно соединение, выбранное из числа сульфисоксазола, метимазола, прилокаина, дифиллина, хинакрин, карбенексолона, акампросата, аминокaproновой кислоты, каберголина, диэтилкарбамазина, цинакальцета, циннаризина, эплеренона, фенолдопама, лефлуномида, левосимендана, сулодексида, тербинафина, зонисамида, этомидата, фенформина, триметазидина, мексилетина, ифенпродила, моксифлоксацина или бромкриптина или их солей.

3. Применение по п.2, при котором комбинация включает, по меньшей мере, следующие соединения:

баклофен, триметазидин и торасемид,  
баклофен, цинакальцет и торасемид,  
баклофен, акампросат и торасемид,  
баклофен, акампросат и торасемид и диэтилкарбамазин или  
баклофен, акампросат и торасемид и ифенпродил.

4. Применение по любому из предшествующих пунктов, при котором комбинация дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

5. Применение по любому из предшествующих пунктов, при котором соединения в указанной комбинации составлены в одной или отдельных композициях(ях) для введения вместе или последовательно.

6. Применение по любому из предшествующих пунктов, при котором соединения вводят субъекту неоднократно.

7. Применение по любому из предшествующих пунктов, при котором соединения или их соли находятся в составе с замедленным высвобождением.

8. Применение по любому из предшествующих пунктов, при котором комбинация включает менее чем 4 мг торасемида.

9. Применение по любому из предшествующих пунктов, при котором комбинация включает менее чем 150 мг баклофена, предпочтительно менее чем 50 мг.

10. Способ стимуляции регенерации нерва или нейрона в субъекте, страдающем от повреждения нерва, выбранного из невротаксии, аксонотмезиса или невротмезиса или невропатии, вызванной прямым физическим инсультом нерва, или от болезни Шарко-Мари-Тута, включающий введение указанному субъекту торасемида и баклофена или их солей, составленных в одну или отдельные композицию(и).

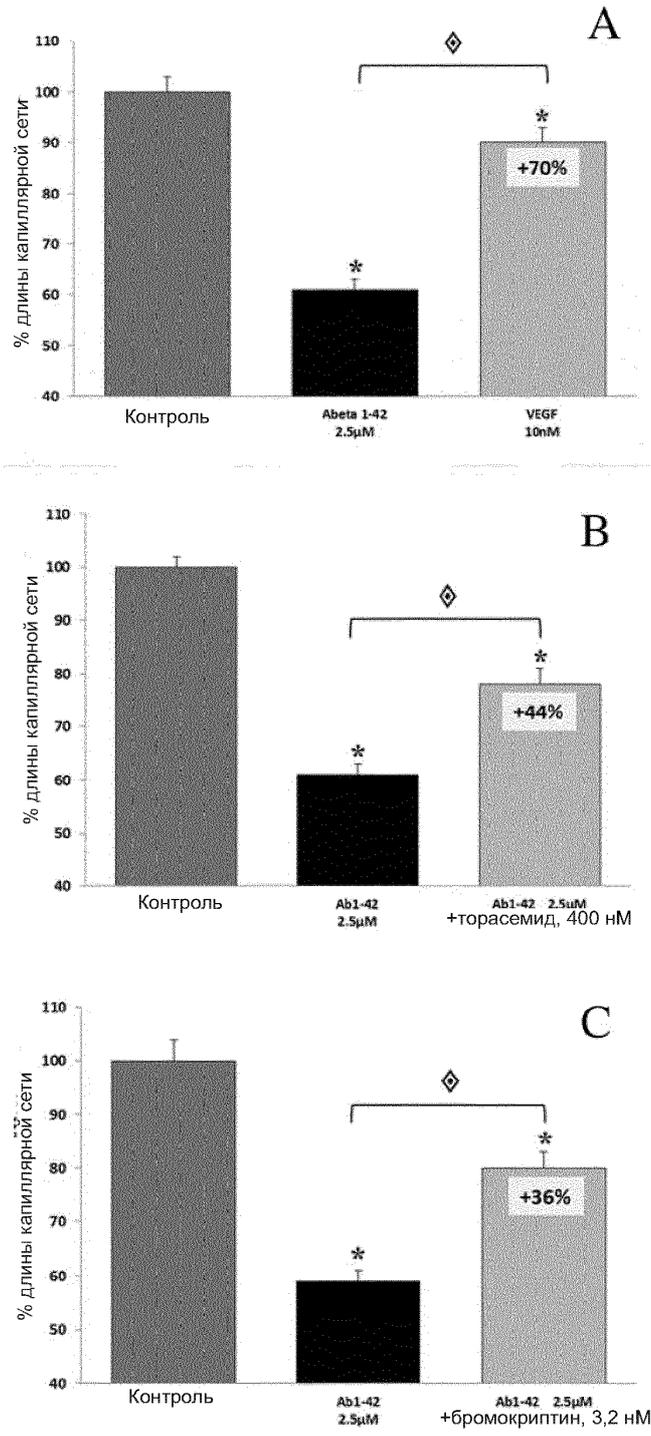
11. Способ по п.10, в котором композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

12. Способ по п.10, включающий одновременное, отдельное или последовательное введение торасемида и баклофена субъекту.

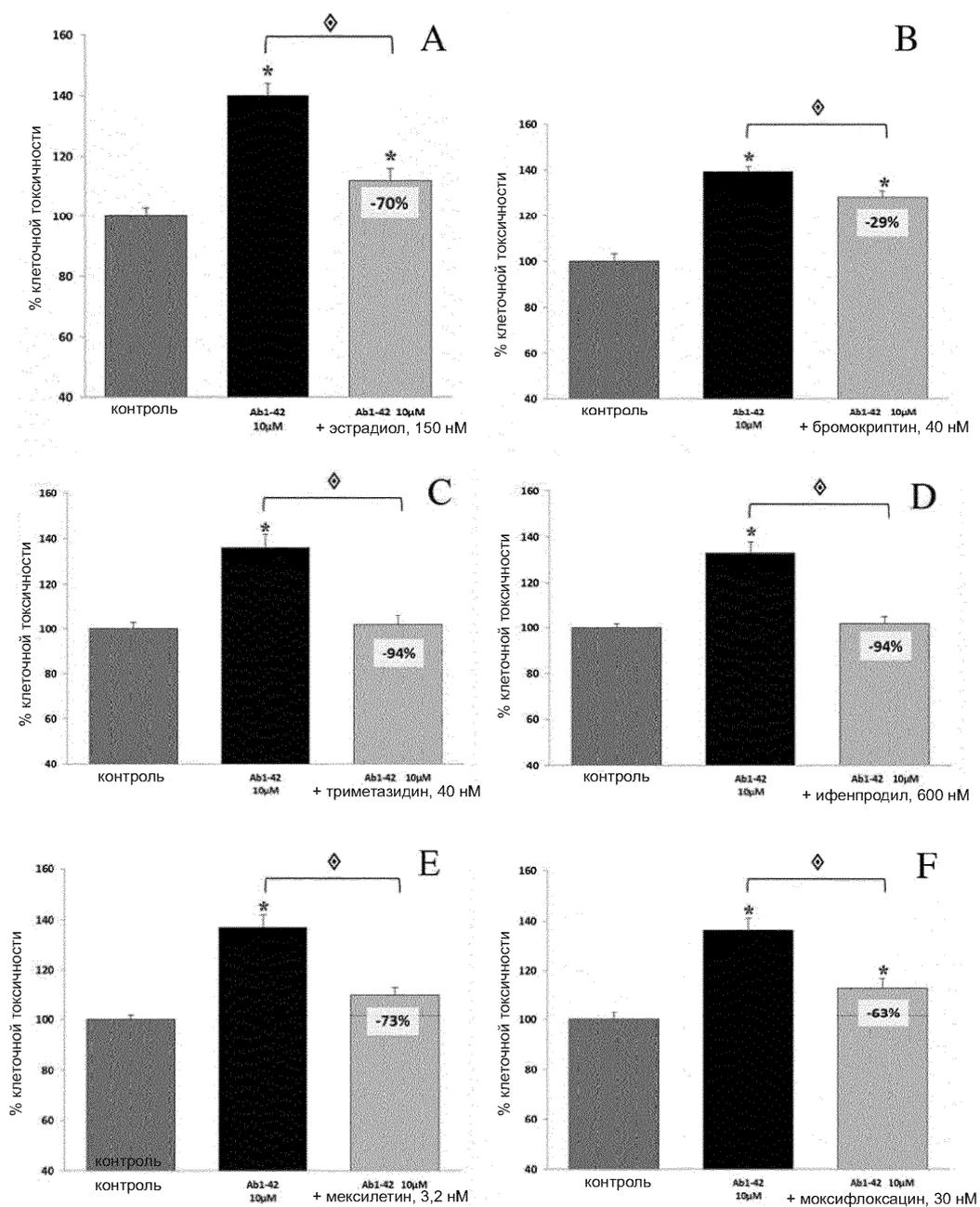
13. Способ по п.10, в котором соединения или их соли находятся в составе(ах) с замедленным высвобождением.

14. Способ по п.10, включающий введение менее чем 4 мг торасемида.

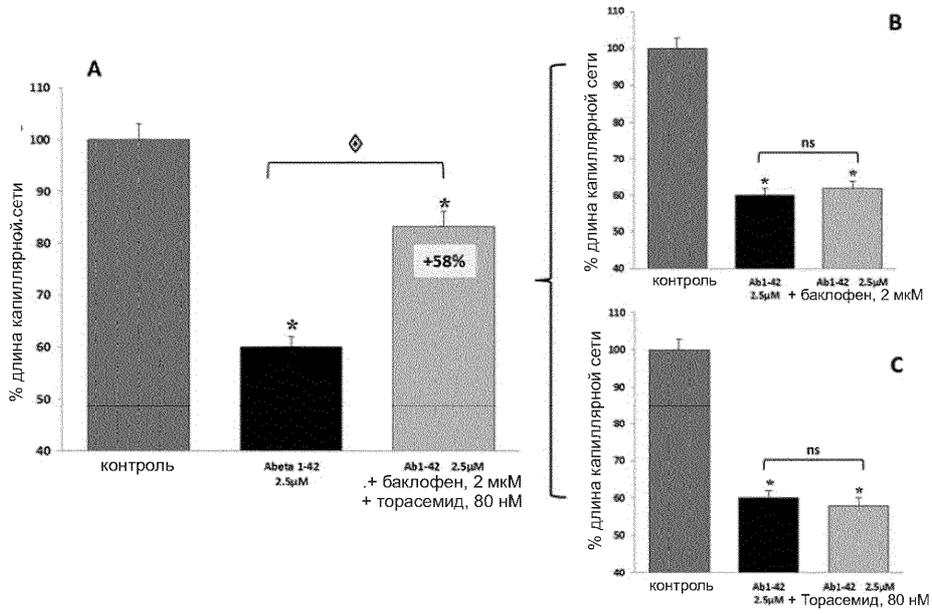
15. Способ по п.10, включающий введение менее чем 150 мг баклофена, предпочтительно менее чем 50 мг.



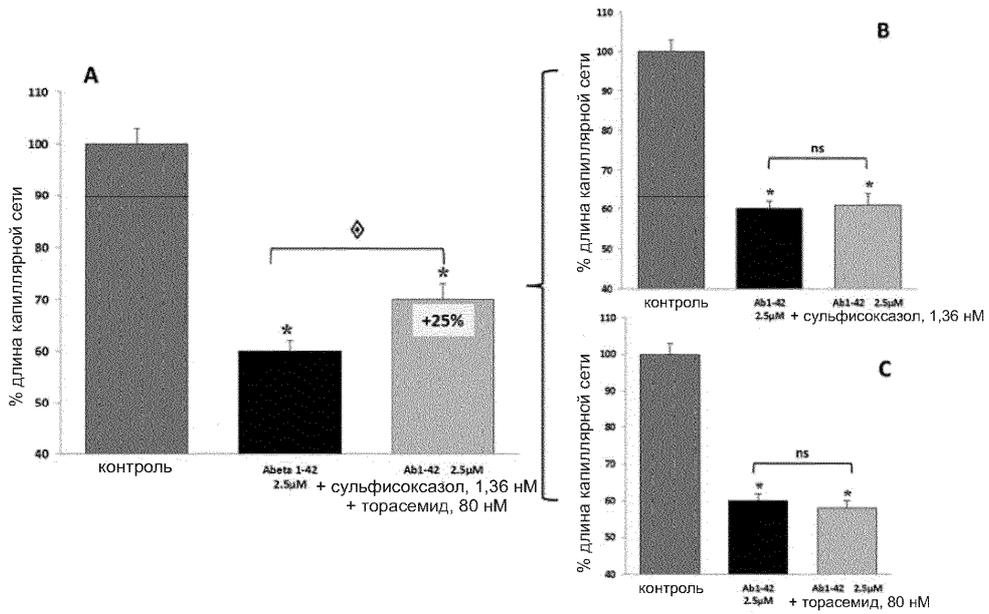
Фиг. 1



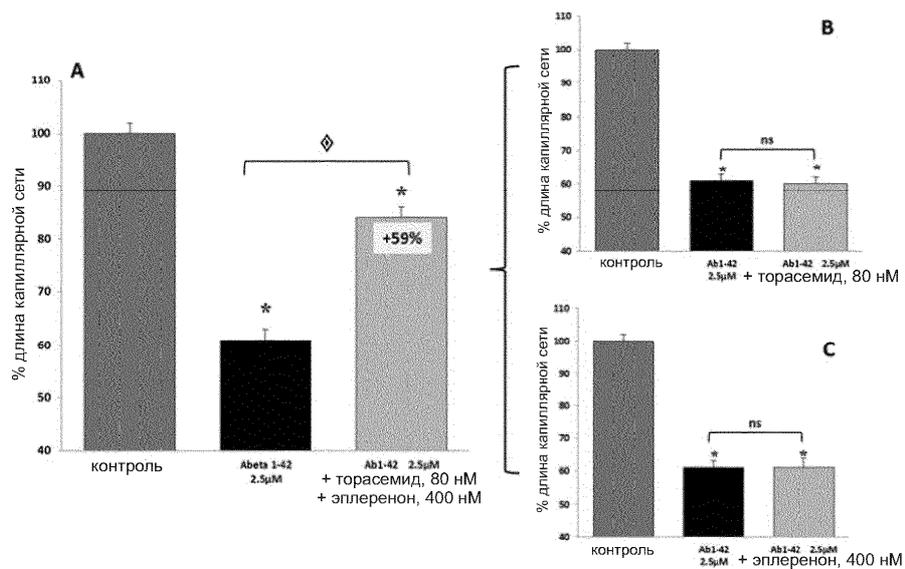
Фиг. 2



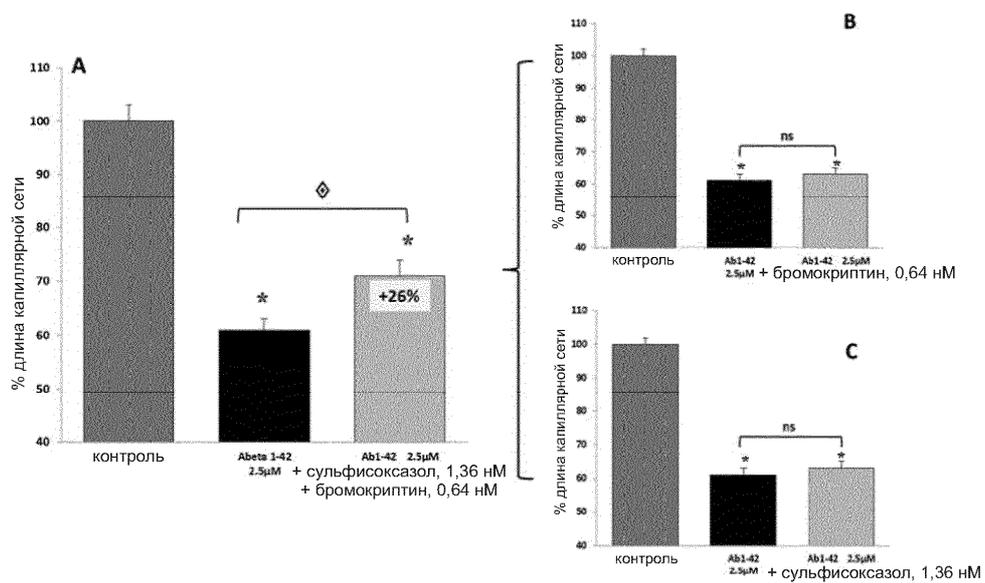
Фиг. 3



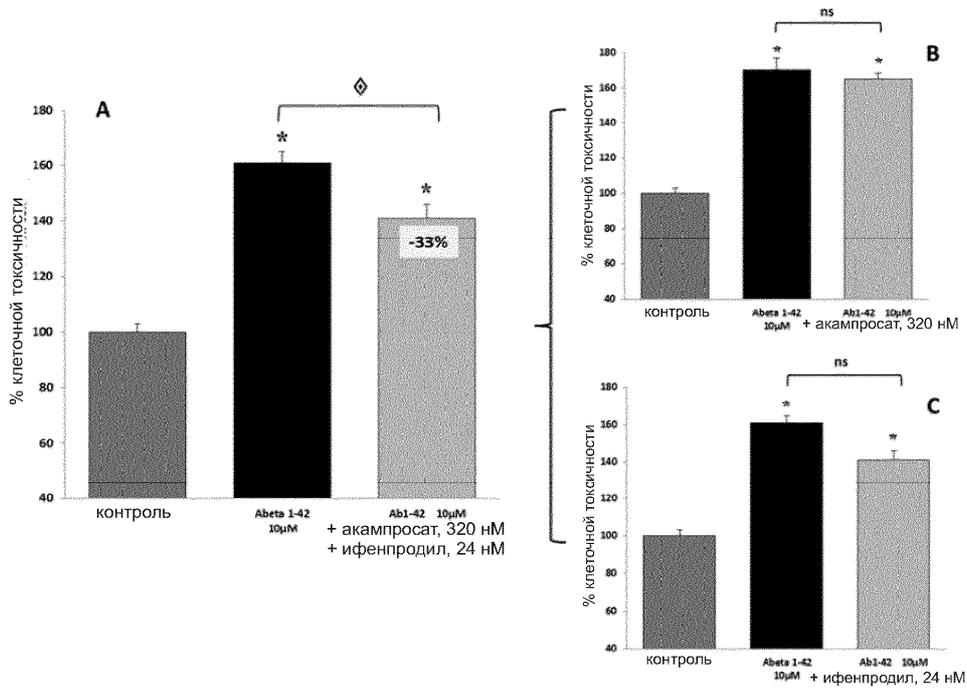
Фиг. 4



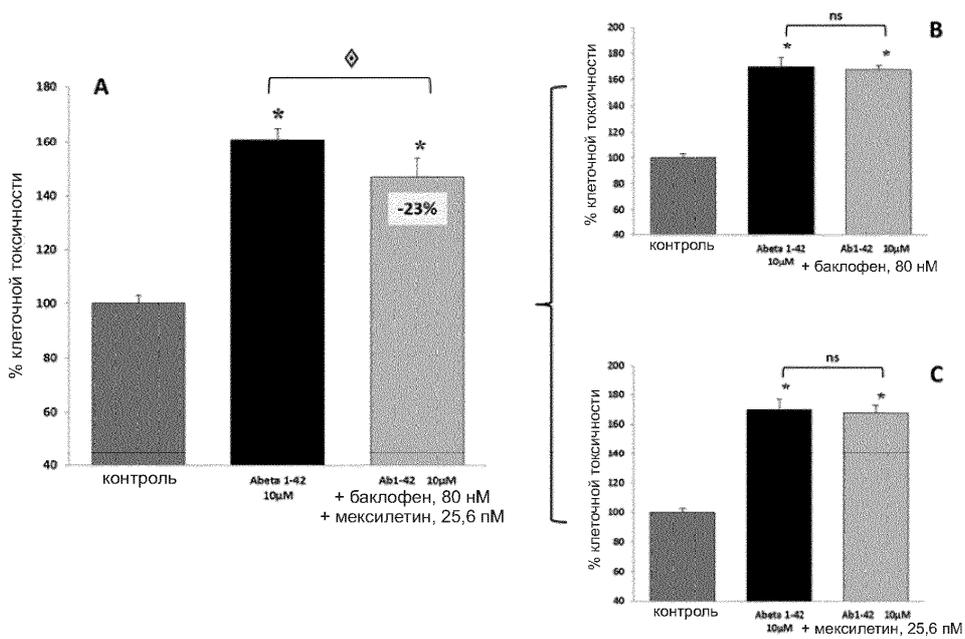
Фиг. 5



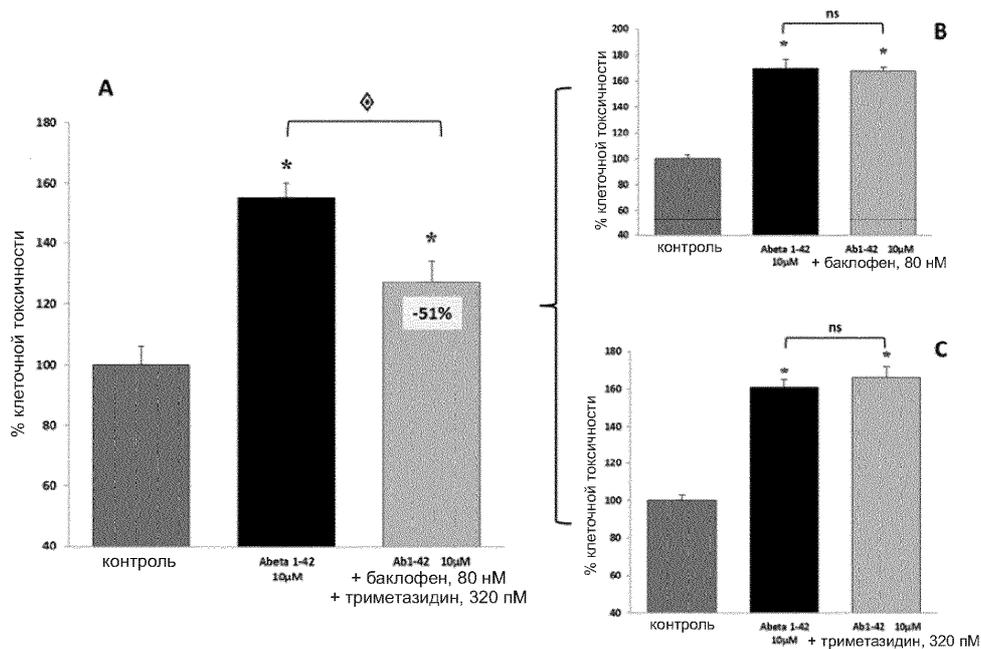
Фиг. 6



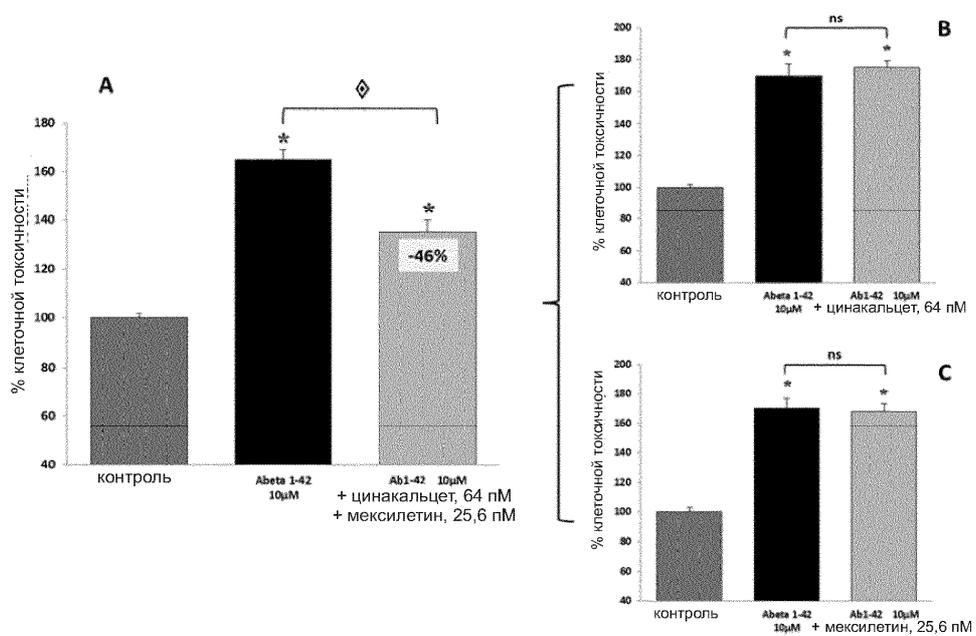
Фиг. 7



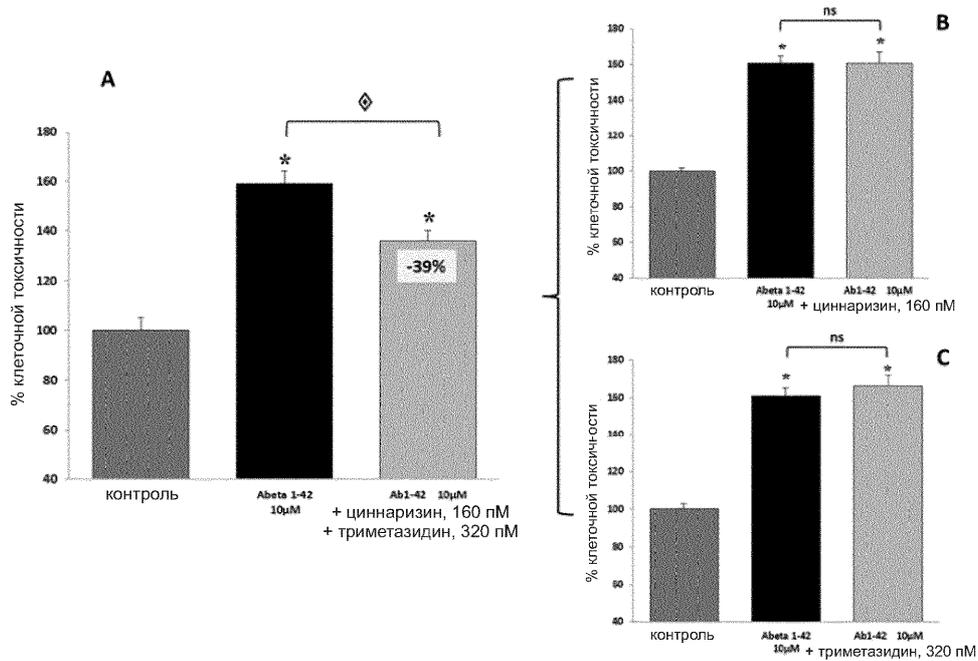
Фиг. 8



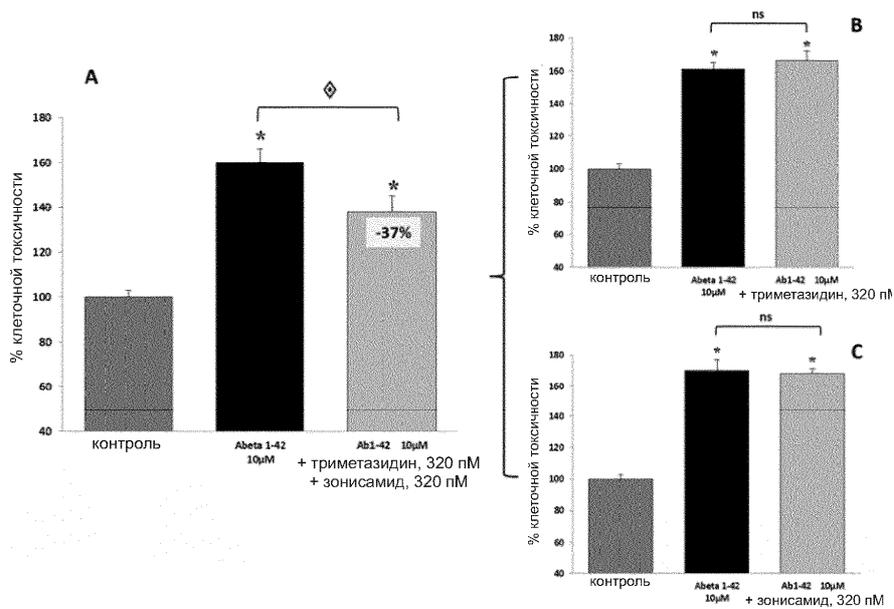
Фиг. 9



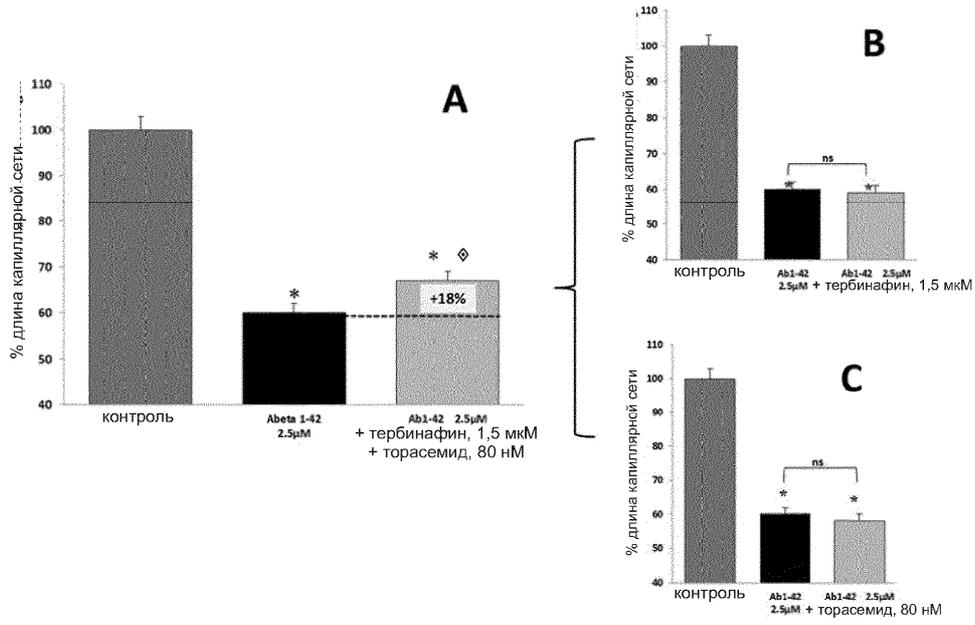
Фиг. 10



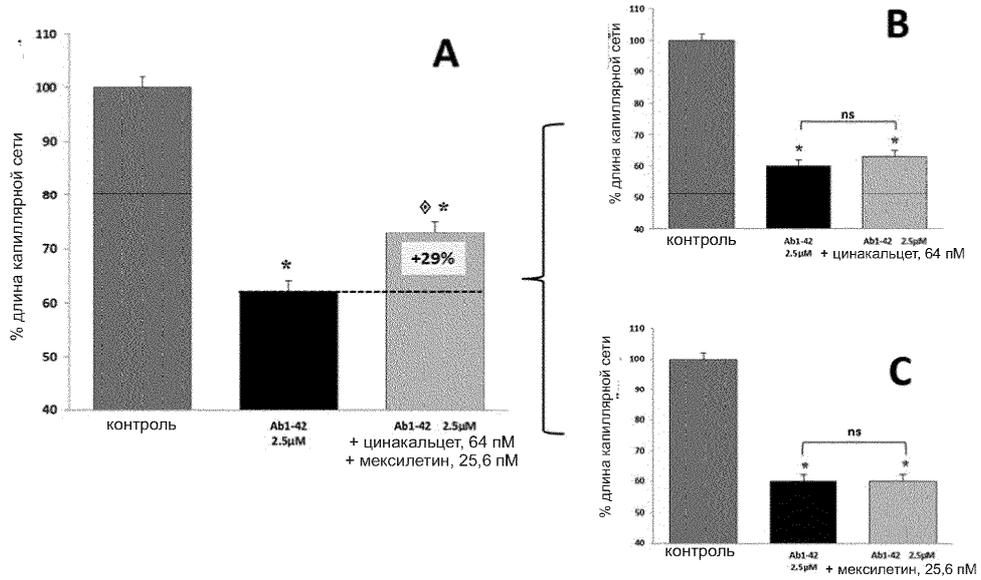
Фиг. 11



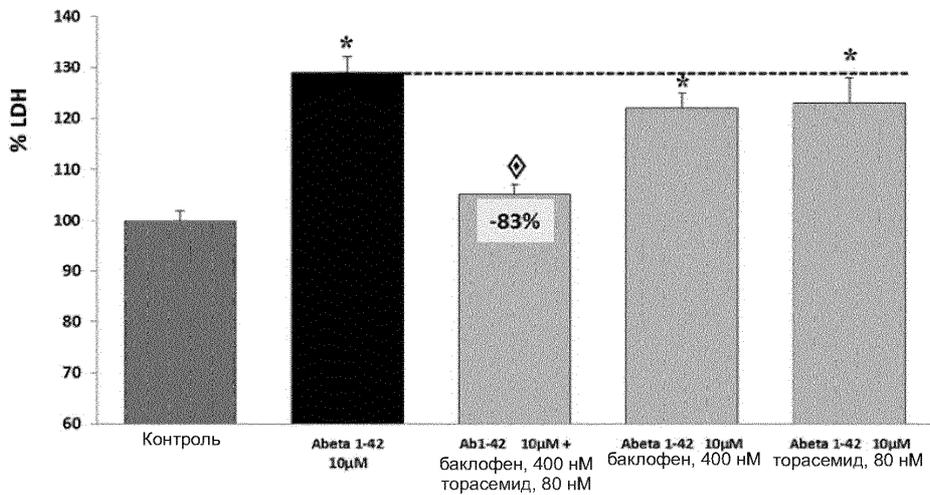
Фиг. 12



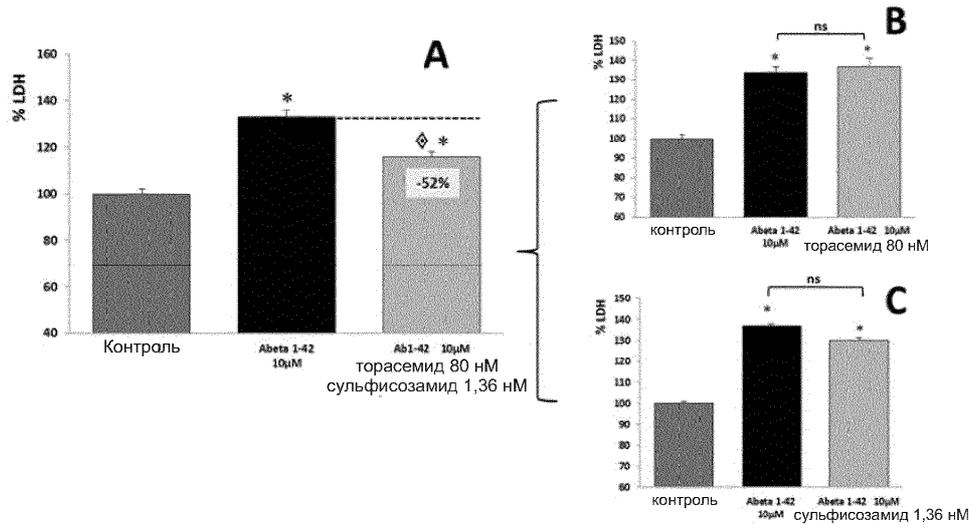
Фиг. 13



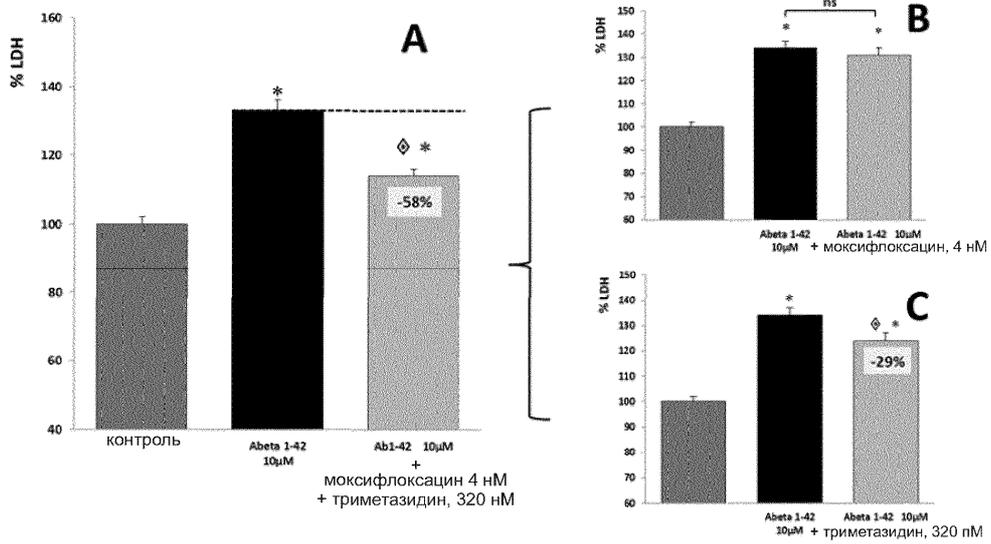
Фиг. 14



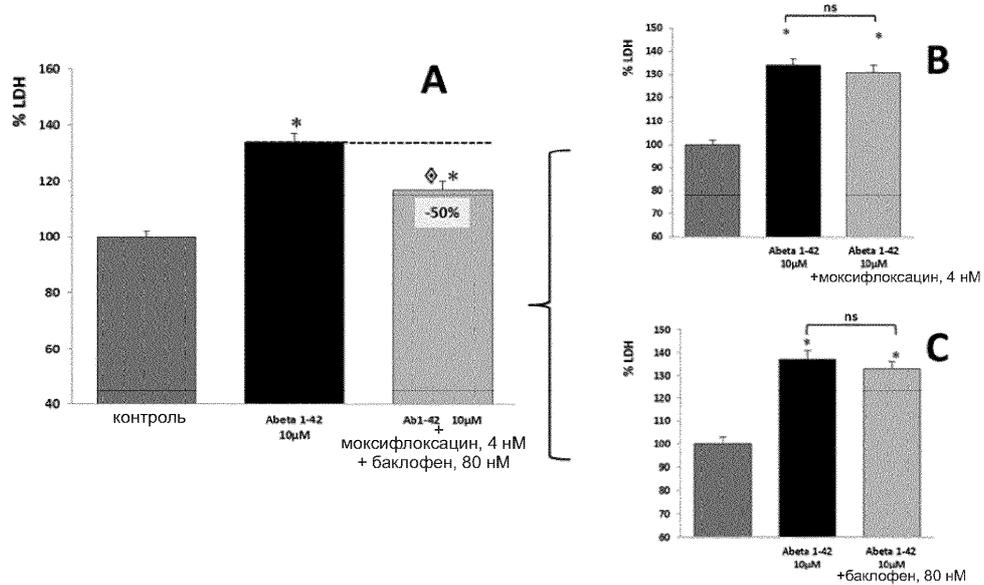
Фиг. 15



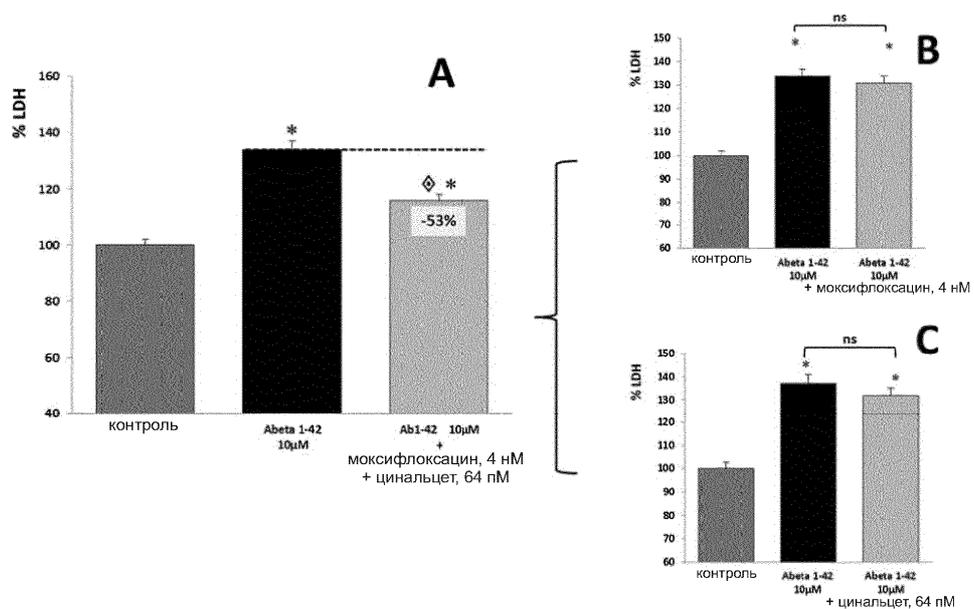
Фиг. 16



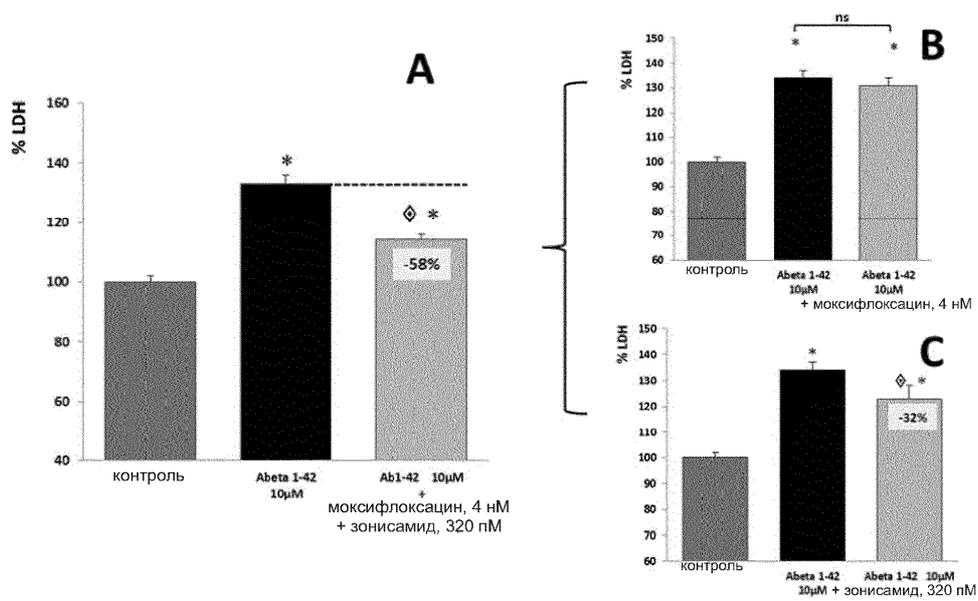
Фиг. 17



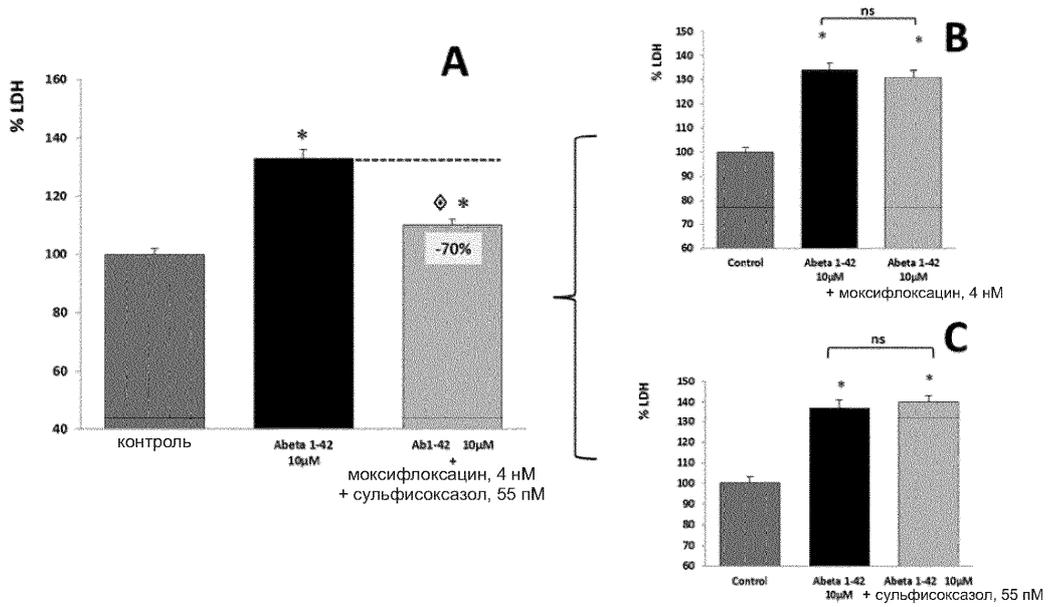
Фиг. 18



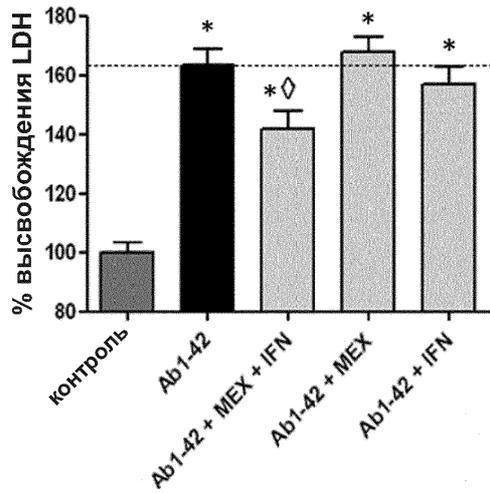
Фиг. 19



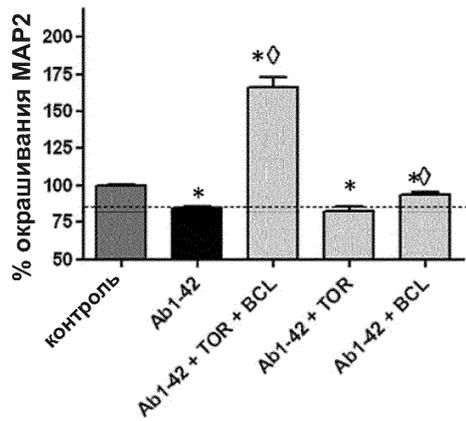
Фиг. 20



Фиг. 21



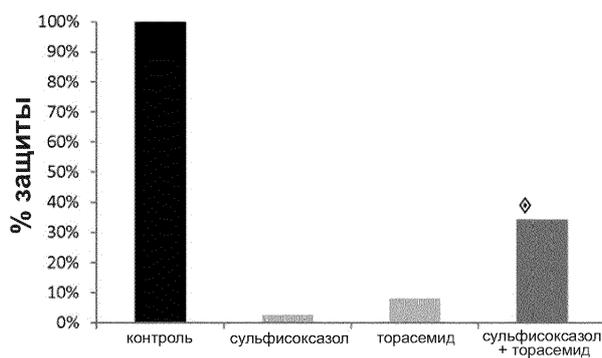
Фиг. 22



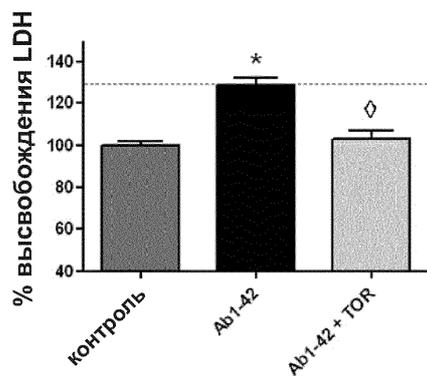
Фиг. 23



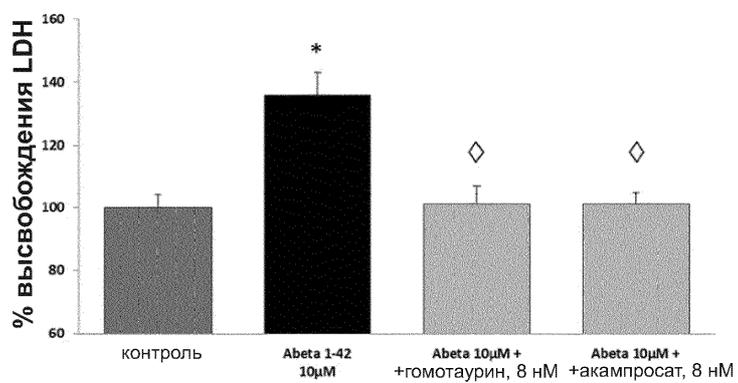
Фиг. 24



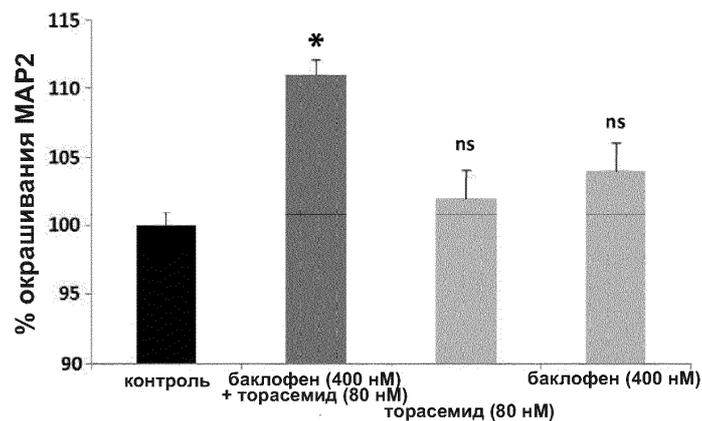
Фиг. 25



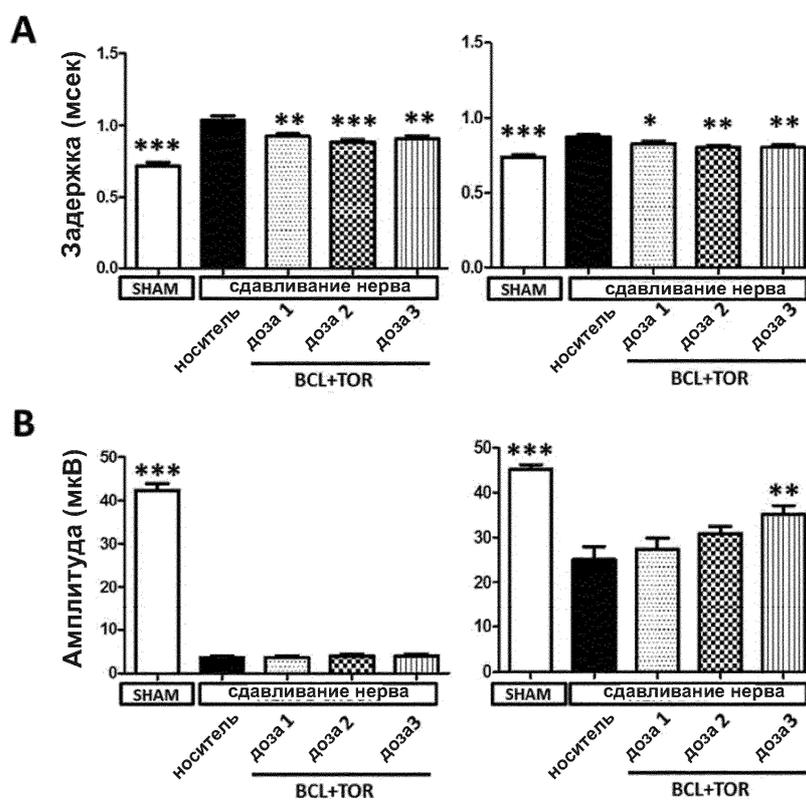
Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28



Фиг. 29

