



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112448** (13) **C2**

(51) МПК (2016.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/498 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 25/00

A61P 37/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 04226	(72) Винахідник(и):	Фатхі Реза (US), МакЛін Патрик Лафлін (CA), Лейтон Гарі Джеферсон (US)
(22) Дата подання заявки:	19.09.2012	(73) Власник(и):	РЕДГІЛ БАЙОФАРМА ЛТД, 21 Ha'arba'a Street, 64739 Tel Aviv, Israel (IL)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	12.09.2016	(74) Представник:	Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/536,824, 61/537,229	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 2011/059136 A1, 10.03.2011 WO 2011/011706 A2, 27.01.2011 US 2008/0275063 A1, 06.11.2008 BORODY ET AL: "Anti-mycobacterial therapy in Crohn's disease heals mucosa with longitudinal scars", DIGESTIVE AND LIVER DISEASE, W.B. SAUNDERS, GB, vol. 39, no. 5, 13 April 2007 (2007-04-13), pages 438-444
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	20.09.2011, 21.09.2011		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.07.2014, Бюл.№ 14		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	12.09.2016, Бюл.№ 17		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/IB2012/002252, 19.09.2012		

(54) КОМПОЗИЦІЯ І СПОСІБ ЛІКУВАННЯ АУТОІМУННОГО ЗАХВОРЮВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується застосування композиції, що містить кларитроміцин, рифабутин і клофазамін, для виготовлення лікарського засобу для лікування розсіяного склерозу.

UA 112448 C2

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка заявляє пріоритет попередньої заявки США, серійний номер 61/536824, поданої 20 вересня 2011, і попередньої заявки США, серійний номер 61/537229, поданої 21 вересня 2011, які включені в опис за допомогою посилання у всій повноті.

5 ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХОД

Дане розкриття стосується застосування композиції для лікування аутоімунного захворювання. Більш детально, композиція включає комбінацію антибіотиків, які можна використовувати для лікування аутоімунних захворювань, включаючи розсіяний склероз.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

10 Розсіяний склероз (РС) являє собою хронічне аутоімунне і демієлінізуюче захворювання, яке вражає головним чином центральну нервову систему. РС характеризується інфільтрацією мієлін-специфічних CD4+ Т-клітин, які вражають мієлінову оболонку аксонів і інші елементи центральної нервової системи (ЦНС), руйнуючи мієлін і базальний аксон.

15 Автори даного винаходу виявили, що комбінація антибіотиків, яка застосовувалася раніше в лікуванні запальних захворювань кишечника, впливає на запальну реакцію суб'єкта, який має аутоімунне захворювання, включаючи РС і інші аутоімунні захворювання.

20 Будь-яке обговорення документів, актів, речовин, пристроїв, статей і т. п., які включені в даний опис, не треба приймати як визнання, що будь-який матеріал або всі вказані матеріали створюють частину відомого рівня техніки, або що вони являли собою загальнодоступні відомості в галузі, яка стосується даного розкриття, через те, що вони існували до дати пріоритету кожного пункту формули даної заявки.

СУТЬ ВІНАХОДУ

Розкриття надає комбінацію рифабутину, кларитроміцину і клофазиміну для лікування аутоімунного захворювання.

25 Розкриття в одному аспекті надає композицію, що містить рифабутин, кларитроміцин і клофазимін, для лікування аутоімунного захворювання.

Дане розкриття також надає композицію, що містить рифабутин, кларитроміцин і клофазимін, для лікування розсіяного склерозу.

30 У іншому аспекті надається композиція, що містить рифабутин, кларитроміцин і клофазимін, для лікування аутоімунного захворювання.

У іншому аспекті надається композиція, що містить рифабутин, кларитроміцин і клофазимін, для лікування розсіяного склерозу (РС).

35 У іншому аспекті надається композиція, що містить комбінацію антибіотичних засобів для лікування розсіяного склерозу, вказана композиція містить рифабутин, кларитроміцин і клофазимін.

У іншому аспекті надається композиція, що містить комбінацію двох або більше антибіотичних засобів для лікування аутоімунного захворювання, вказані два або більше антибіотичних засобів вибирають із рифабутину, клофазиміну і щонайменше одного макроліду.

40 У іншому аспекті надається композиція, що містить комбінацію двох або більше антибіотичних засобів для лікування аутоімунного захворювання, вказані два або більше антибіотичних засобів вибирають із рифабутину, клофазиміну і кларитроміцину.

45 У іншому аспекті надається композиція, що містить комбінацію двох або більше антибіотичних засобів для лікування аутоімунного захворювання, вказані два або більше антибіотичних засобів вибирають із клофазиміну, кларитроміцину і щонайменше одного антибіотика, який має бактерицидну активність.

У іншому аспекті дане розкриття надає спосіб лікування аутоімунного захворювання у пацієнта, що включає введення композиції, яка містить рифабутин, кларитроміцин і клофазимін, вказаному пацієнту.

50 У іншому аспекті надається спосіб лікування пацієнта, який має аутоімунне захворювання, і який має інфекцію, або сприйнятливий до інфекції, яка викликається *Mycobacterium*, що включає введення пацієнту композиції, яка містить рифабутин, кларитроміцин і клофазимін.

У іншому аспекті надається спосіб лікування пацієнта, який має розсіяний склероз, вказаний пацієнт також має позитивний результат тесту на визначення мікобактеріальної інфекції, що включає введення пацієнту композиції, яка містить рифабутин, кларитроміцин і клофазимін.

55 У іншому аспекті дане розкриття надає спосіб лікування аутоімунного захворювання у пацієнта, що включає введення композиції, яка містить комбінацію антибіотиків, вибраних з групи, що включає рифабутин, кларитроміцин і клофазимін, вказаному пацієнту.

60 У іншому аспекті дане розкриття надає спосіб лікування розсіяного склерозу у пацієнта, що включає введення композиції, яка містить комбінацію антибіотиків, вибраних з групи, що включає рифабутин, кларитроміцин і клофазимін, вказаному пацієнту.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фігура 1 являє собою графік, що демонструє ефекти введення RHB-104 на концентрацію цитокіну IL-17 в мишачій моделі;

5 Фігура 2 являє собою графік, що демонструє ефекти введення RHB-104 на концентрацію цитокіну TNF-альфа в мишачій моделі;

Фігура 3 являє собою графік, що демонструє ефекти введення RHB-104 на концентрацію цитокіну IFN-гамма в мишачій моделі;

Фігура 4 являє собою графік, що демонструє ефекти введення RHB-104 на концентрацію цитокіну IL-6 в мишачій моделі;

10 Фігура 5 являє собою графік, що демонструє ефекти введення RHB-104 на концентрацію цитокіну IL-2 в мишачій моделі;

Фігура 6 являє собою графік, що демонструє тяжкість EAE в різних групах лікування в загальноприйнятій мишачій моделі РС;

15 Фігура 7 являє собою графік, що демонструє зміну маси тіла в різних групах лікування в загальноприйнятій мишачій моделі РС;

Фігура 8 являє собою графік, що демонструє середню кількість вогнищ запалення, які виявляються гістологічно (в зрізах H&E) в контрольній групі і в групі лікування в загальноприйнятій мишачій моделі РС;

20 Фігура 9 являє собою графік 9, на якому представлена середня оцінка демієлінізації, отримана внаслідок гістологічного аналізу (на основі зрізів, забарвлених барвником люксом швидким блакитним) в контрольній групі і в групі лікування в загальноприйнятій мишачій моделі РС;

25 Фігура 10 являє собою графік, на якому представлена середня оцінка демієлінізації, отримана гістологічно (на основі зрізів H&E) в контрольній групі і в групі лікування в загальноприйнятій мишачій моделі РС;

Фігура 11 являє собою графік, на якому показана середня кількість апоптотичних клітин, які визначаються гістологічно (в зрізах H&E) в контрольній групі і в групі лікування в загальноприйнятій мишачій моделі РС; і

30 Фігура 12 являє собою графік, на якому показана тяжкість рецидиву захворювання в різних групах лікування в загальноприйнятій мишачій моделі.

ОПИС ПРИКЛАДІВ ЗДІЙСНЕННЯ РОЗКРИТТЯ

Термін "розсіяний склероз" також включає варіанти розсіяного склерозу, такі, як оптиконевромієліт (хвороба Девіка), дифузний склероз, транзиторний склероз, гострий розсіяний енцефаломієліт і неврит зорового нерва.

35 Застосування терміну "суб'єкт" охоплює як людину, так і тварин.

"Лікування" означає, що досягається щонайменше зменшення інтенсивності симптомів, асоційованих зі станом (наприклад, з РС), що вражає суб'єкта, де зменшення інтенсивності використовують у широкому значенні для позначення щонайменше зменшення величини параметра, наприклад, симптому, асоційованого зі станом, який лікують. По суті, лікування також включає ситуації, в яких стан або щонайменше симптоми, асоційовані з ним, повністю пригнічують, наприклад, запобігають появі, або зупиняють, наприклад, припиняють, так що суб'єкт вже не страждає від стану, або щонайменше симптомів, які характеризують стан. "Лікування" також включає запобігання епізоду загострення у суб'єкта або у випадку, якщо епізод загострення має місце, то термін "лікування" потрібно розуміти, як вказане вище.

45 Згідно із заявленими способами можна лікувати різних суб'єктів. У багатьох варіантах здійснення суб'єкти є "ссавцями", в тих випадках, коли вказані терміни використовують в широкому значенні для опису організмів, які належать до класу ссавців, який включає ряд м'ясоїдних (наприклад, собаки і кішки), ряд гризунів (наприклад, миші, морські свинки і щури) і ряд приматів (наприклад, людина, шимпанзе і мавпи). У багатьох варіантах здійснення суб'єкти являють собою людину. Нарівні з тим, що даний винахід можна використовувати для лікування суб'єкта-людини, потрібно розуміти, що заявлені способи також можна здійснити відносно інших суб'єктів-тварин, таких, як, але без обмеження, миші, щури, собаки, кішки, домашня худоба, коні і т. д. Відповідно потрібно розуміти, що будь-який суб'єкт, який потребує лікування згідно з винаходом, що розглядається, є прийнятним.

55 Крім того, прийнятні суб'єкти даного винаходу включають суб'єктів, які раніше мали або не мали який-небудь стан, у яких раніше був виявлений ризик виникнення стану, і суб'єктів, у яких первинно діагностовано або виявлено поточне ураження яким-небудь станом або наявність якого-небудь стану.

60 Лікування можна оцінити за допомогою одного або більше критеріїв. Оцінка вказаного лікування може бути або кількісною, або якісною, або як кількісною, так і якісною. Оцінка

лікування може бути здійснена на основі клінічної шкали тяжкості захворювання. У суб'єктів, які одержують лікування з приводу аутоімунного захворювання, такого, як РС, лікування можна оцінити за допомогою декількох шкал, таких, як Розширена шкала інвалідизації (EDSS), Індекс ходьби (AI) або Шкала оцінки неврологічного статусу Скріпса (SNRS).

5 Оцінка лікування може включати оцінку одного або більше симптомів, асоційованих із певним захворюванням. У прикладі РС симптоми включають: слабкість і/або оніміння однієї або більше кінцівок; поколювання в кінцівках і відчуття скутості в тілі або кінцівках; волочіння або незадовільний контроль однієї або обох ніг аж до спастичного або атаксичного парезу; гіперактивні сухожильні рефлексії; зникнення черевних рефлексів; симптом Лермітта; ретробульбарний неврит або неврит зорового нерва; нестійкість при ходьбі; симптоми ураження стовбура мозку (диплопія, запаморочення, блювота); порушення сечовипускання; геміплегія; невралгія трійчастого нерва; інші больові синдроми; ністагм і атаксія; атаксія мозочкового типу; тріада Шарко; диплопія; білатеральна між'ядерна офтальмоплегія; міокімія або параліч м'язів обличчя; глухота; дзвін у вухах; неформовані слухові галюцинації; запаморочення і блювота; транзиторна лицьова втрата чутливості або невралгія трійчастого нерва; дисфункція сечового міхура; ейфорія; депресія; деменція, тупий ниючий біль в поясиці; гострі, пекучі болі, що погано локалізуються в кінцівці або в обох ногах, і оперізувальні болі; раптові загострення неврологічного розладу; дизартрія і атаксія; пароксизмальний біль і дизестезія в кінцівці; спалахи світла; пароксизмальний свербіж; і/або тонічні судоми, що приймають форму згинального (дистонічного) спазму руки, кисті і ліктя з розпрямленням нижньої кінцівки.

20 При РС зменшення інтенсивності симптомів захворювання також включає зменшення кількості епізодів запалення ("епізод" включає будь-який вказаний вище клінічний вияв або комбінацію щонайменше вказаних вище клінічних виявів), сповільнення прогресування захворювання або зменшення/уповільнення появи ушкоджень мозку (що ідентифікуються за допомогою магнітно-резонансної томографії). Рекурентність захворювань, включаючи РС, можна поліпшити шляхом зниження тяжкості симптомів (наприклад, симптомів, описаних вище), асоційованих з епізодом РС, або шляхом подовження періоду часу між появою епізодів.

При РС і асоційованих захворюваннях, також можна використовувати кількісний аналіз для оцінки лікування. Приклади методик кількісного аналізу включають ідентифікацію біологічних маркерів. Приклади включають, але без обмеження, біомаркери, які відображають зміну імунної системи; біомаркери порушення гематоенцефалічного бар'єра, демієлінізації, оксидативних станів і ексайтотоксичності, гліюзу або ремієлінізації і відновлення. Можна оцінити панель різних маркерів, яка відображає різні стадії захворювання, включаючи різні стадії запалення, демієлінізації, аксональної дегенерації і ремієлінізації.

35 Потрібно розуміти, що оцінка лікування може бути отримана внаслідок декількох способів і може ґрунтуватися як на клінічному вияві, так і на аналізі різних неклінічних маркерів, таких, як біомаркери. При захворюваннях, таких, як РС, які є комплексними захворюваннями з декількома патофізіологічними механізмами, які неоднорідні в підгрупах пацієнтів з РС, необхідно оцінювати види лікування на основі різних і відмінних критеріїв і маркерів, і потрібно розуміти, що наведені вище приклади оцінки лікування не складають повний перелік, а лише дають приклад способів, за допомогою яких можна оцінити лікування.

40 Потрібно розуміти, що в даному описі слово "включати" або його варіанти, такі, як "включає" або "що включає", мають на увазі включення вказаного елемента, цілого числа або стадії, або групи елементів, цілих чисел або стадій, але не виключення будь-якого іншого елемента, цілого числа або стадії або груп елементів, цілих чисел або стадій.

45 Композиція даного розкриття також може включати щонайменше один антибіотик, активний відносно грампозитивних бактерій, - "Грампозитивний антибіотик". Грампозитивний антибіотик можна вибрати з одного або більше антибіотиків групи, яка включає даптоміцин, кліндаміцин, рифампіцин, еритроміцин, олеандоміцин, рокситроміцин, азитроміцин, канаміцин, гентаміцин, тобраміцин, стрептоміцин, неоміцин, паромоміцин, етамбутол, ізоніазид, міноциклін, тетрациклін.

Термін "один або більше" антибіотичних засобів включає, але без обмеження, один, два, три, чотири, п'ять, шість і т. д. антибіотичних засобів. Потрібно розуміти, що фахівець в даній галузі може емпірично визначити конкретну кількість антибіотичних засобів, необхідних для застосування згідно з варіантами здійснення, запропонованими в описі і відомими в даній галузі.

55 Дані композиції можна використовувати для лікування пацієнта, який має аутоімунне захворювання, де вказаний пацієнт також має позитивні результати тестів на інфекцію, що викликається бактерією *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP).

Аутоімунне захворювання може являти собою розсіяний склероз.

Більше того, аутоімунне захворювання може являти собою тиреоїдит Хашимото, синдром Мелькерсона-Розенталя, саркоїдоз або інші схожі захворювання.

У іншому варіанті здійснення термін "аутоімунне захворювання" включає будь-яке захворювання з великої групи захворювань, які характеризуються аномальним функціонуванням імунної системи, що приводить до утворення антитіл проти власної тканини.

Розкриті антибіотики або композиції можна ввести перорально. Альтернативно антибіотики можна ввести внутрішньовенно.

Розглядаються інші шляхи введення, включаючи, але без обмеження, внутрішньом'язовий і внутрішньокістковий шляхи.

Кожний антибіотик можна ввести окремо. Альтернативно два або більше антибіотики можна ввести разом.

У одному варіанті здійснення композиції, що пропонуються в описі, включають щонайменше два антибіотичні засоби, які спільно включають в одну лікарську форму. У іншому варіанті здійснення композиція, що пропонується в описі, містить щонайменше три антибіотики, які спільно включають в одну лікарську форму.

У одному варіанті здійснення кожний з антибіотиків рифабутин, кларитроміцин і клофазимін спільно включають в одну лікарську форму.

Альтернативно кожний антибіотик можна включити в лікарську форму окремо від інших антибіотичних засобів. У вказаному варіанті здійснення передбачається, що окремі лікарські форми будуть упаковані разом в наборі, звичайно, щоб забезпечити одночасний прийом пацієнтом кожної з лікарських форм. У іншому варіанті здійснення два антибіотичні засоби можуть бути включені в одну першу лікарську форму і антибіотичний засіб(и), що залишився, може бути окремо включено у другу лікарську форму, яку треба приймати разом з першою лікарською формою.

У одному варіанті здійснення дані антибіотики і композиції можуть надаватися в формі таблетки, що містить щонайменше один антибіотик з рифабутину, кларитроміцину і клофазиміну в порошкоподібній формі. У ряді випадків два або всі три препарати, вибрані з рифабутину, кларитроміцину і клофазиміну, представлені в порошкоподібній формі. Альтернативно дані композиції можуть бути представлені у вигляді капсули в формі таблетки, що містить щонайменше одну речовину, вибрану з рифабутину, кларитроміцину і клофазиміну в мікроінкапсульованій формі. У одному варіанті здійснення два або всі препарати, вибрані з рифабутину, кларитроміцину і клофазиміну, знаходяться в мікроінкапсульованій формі.

У іншому варіанті здійснення дані композиції можуть бути представлені у вигляді капсули в формі таблетки, що містить щонайменше один антибіотик, вибраний з рифабутину, кларитроміцину і клофазиміну в порошкоподібній формі, і інші речовини, представлені в мікроінкапсульованій формі. Як додаткова можливість, дані композиції можуть бути представлені у вигляді капсули в формі таблетки, що містить одну речовину або більше з рифабутину, кларитроміцину і клофазиміну, представлених в мікрогранульованій формі. У додаткових варіантах здійснення дані композиції можуть бути представлені в формі таблетки, що містить одну або більше речовин, вибраних із рифабутину, кларитроміцину і клофазиміну, всередині капсули; капсули, що містить одну або більше речовин, вибраних із рифабутину, кларитроміцину і клофазиміну всередині таблетки; капсули, що містить одну або більше речовин, вибраних із рифабутину, кларитроміцину і клофазиміну, всередині зовнішньої капсули, що містить інші речовини, або будь-яку комбінацію з вказаних вище.

У іншому варіанті здійснення дані композиції включають внутрішню капсулу, що містить рифабутин, всередині зовнішньої капсули, яка містить кларитроміцин і клофазимін, де кларитроміцин і клофазимін можуть бути представлені в порошкоподібній, мікроінкапсульованій або мікрогранульованій формах. Більш того, дані композиції можуть містити форми, включені в ліпосоми, не інкапсульовані форми або включені в ліпосоми форми з полімерним покриттям.

Дані способи можна здійснити шляхом введення однієї або більше таблеток/капсул, що містять рифабутин, кларитроміцин і клофазимін, як описано вище, або шляхом введення кожного із вказаних антибіотиків окремо. У переважних варіантах здійснення рифабутин, кларитроміцин, і клофазимін вводять одночасно в одній дозі.

Дані композиції можна отримати за допомогою способів, відомих в даній галузі, для отримання фармацевтичних композицій, включаючи змішування на блендері, подрібнення, гомогенізацію, суспендування, розчинення, емульгування, диспергування і, коли доречно, змішування рифабутину, кларитроміцину і клофазиміну разом із вибраними допоміжними речовинами, розбавляючими речовинами, носіями і активуючими речовинами.

У випадку перорального введення дані композиції можуть бути представлені в формі таблеток, пастилок, пілюль, коржиків, капсул, еліксирів, порошків, включаючи ліофілізовані

порошки, розчинів, гранул, суспензій, емульсій, сиропів і настоянок. Дані композиції можуть включати форми з уповільненим вивільненням або форми з відстроченим вивільненням лікарської речовини, наприклад, у формі покритих частинок, багатошарових таблеток або мікрогранул.

- 5 Тверді форми даних композицій для перорального введення можуть містити фармацевтично прийнятні зв'язувальні речовини, підсолоджувачі, дезінтегруючі речовини, розбавляючі речовини, ароматизатори, покривні речовини, консерванти, лубриканти і/або речовини, що сповільнюють вивільнення. Прийнятні зв'язувальні речовини включають
- 10 аравійську камедь, желатин, кукурудзяний крохмаль, трагакантову камедь, альгінат натрію, карбоксиметилцелюлозу або поліетиленгліколь (PEG). Прийнятні підсолоджувачі включають сахарозу, лактозу, глюкозу, аспартам або сахарин. Прийнятні дезінтегруючі речовини включають кукурудзяний крохмаль, метилцелюлозу, полівінілпіролідон, ксантанову смолу, бентоніт, альгінову кислоту або агар. Прийнятні розбавляючі речовини включають лактозу, сорбіт, маніт, декстрозу, каолін, целюлозу, карбонат кальцію, силікат кальцію або дикальцію
- 15 фосфат. Прийнятні смакові добавки включають м'ятну олію, вінтергренуву олію, ароматизатор зі смаком вишні, апельсина або малини. Прийнятні покривні речовини включають полімери або співполімери акрилової кислоти і/або метакрилової кислоти і/або їх складні ефіри, воски, жирні спирти, зеїн, шелак або глютен. Прийнятні консерванти включають бензоат натрію, вітамін Е, альфа-токоферол, аскорбінову кислоту, метилпарабен, пропілпарабен або бісульфат натрію.
- 20 Прийнятні лубриканти включають стеарат магнію, стеаринову кислоту, олеат натрію, хлорид натрію або тальк. Прийнятні речовини, що сповільнюють вивільнення, включають гліцерилмоностеарат або гліцерилдистеарат.

- Рідкі форми даних композицій для перорального введення можуть містити, в доповнення до вказаних вище речовин, рідкий носій. Прийнятні рідкі носії включають воду, олії, такі, як
- 25 оливкова олія, арахісова олія, кунжутна олія, соняшникова олія, сафлорова олія, горіхова олія, кокосова олія, рідкий вазелін, етиленгліколь, пропіленгліколь, поліетиленгліколь, етанол, пропанол, ізопропанол, гліцерин, жирні спирти, тригліцериди або їх суміші.

- Суспензії даних композицій для перорального введення можуть також включати диспергуючі речовини і/або суспендувальні речовини. Прийнятні суспендувальні речовини включають такі
- 30 речовини, як карбоксиметилцелюлоза натрію, метилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза, полівінілпіролідон, альгінат натрію або цериловий спирт. Прийнятні диспергуючі речовини включають лецитин, поліоксіетиленовий ефір жирних кислот, таких, як стеаринова кислота, поліоксіетиленсорбіт моно- або ди- олеат, -стеарат або -лаурат, поліоксіетиленсорбітан моно- або ди- олеат, -стеарат або -лаурат і т. п.

- 35 Емульсії даних композицій для перорального введення можуть також включати одну або більше емульгуючих речовин. Прийнятні емульгуючі речовини включають диспергуючі речовини, відповідно до прикладів, наведених вище, або природні камеді, такі, як аравійська камедь або трагакантова камедь.

- Кожний антибіотик можна вводити щодня. Альтернативно кожен антибіотик можна вводити
- 40 два рази на день. У іншому варіанті здійснення кожен антибіотик можна вводити три рази на день. У іншому варіанті здійснення кожен антибіотик можна вводити виходячи з викладеного: кожні 3 години, кожні 4 години, кожні 5 годин, кожні 6 годин, кожні 7 годин, кожні 8 годин, кожні 9 годин, кожні 10 годин, кожні 11 годин або кожні 12 годин. Введення вказаних антибіотиків може відбуватися протягом періоду часу тривалістю 1 тиждень, 2 тижні, 3 тижні, 4 тижні, 5 тижнів, 6
- 45 тижнів, 7 тижнів, 8 тижнів або більше. Потрібно враховувати, що період лікування може продовжуватися протягом 3 місяців, 4 місяців, 5 місяців, 6 місяців, 7 місяців, 8 місяців, 9 місяців, 10 місяців, 11 місяців або 1 рік або більше.

- Доза кларитроміцину може складати від 250 мг до 1,5 г на день, частіше приблизно 950 мг на день. Вказані 950 мг можна вводити в 95 мг капсулах, при цьому потрібно десять капсул на
- 50 день. Типова доза рифабутину складає від 150 мг до 750 мг на день, частіше приблизно 450 мг на день. Типова доза клофазиміну складає від 50 до 500 мг на день. Звичайно доза клофазиміну становить приблизно 100 мг/день. Вказані 100 мг можна вводити в 10 мг капсулах, десять разів на день. Дозу клофазиміну також можна розрахувати за масою, і вона може складати приблизно від 1 мг/кг до 6 мг/кг, частіше приблизно 2 мг/кг.

- 55 Для дітей передбачені наступні дози (в мг/день):

Вага дитини (кг)	15-30	30-45
кларитроміцин	225-550	450-675
клофазимін	50	75
рифабутин	258	180

У іншому варіанті здійснення наростаюче дозування у дітей може являти собою дозування, яке представлено нижче.

Наприклад:

5

антибіотик	кількість у капсулах									
кларитроміцин	95	190	285	380	475	570	665	760	855	950
клофазимін	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
рифабутин	45	90	135	180	225	270	315	360	405	450

Маса дитини 15-29,9 кг

Тижні 1, 2&3=1 капсула на день

10 Тижні 4&5=1 капсула два рази на день (BID)

Тижні 6&7=3 капсули на день

Тижні 8 і пізніше = за 2 капсули два рази на день (BID)

Вага дитини 30-45 кг

Тиждень 1=1 капсула на день

15 Тижні 2&3=1 капсула два рази на день (BID)

Тижні 4&5=3 капсули на день

Тижні 6&7=2 капсули два рази на день (BID)

Тижні 8 і пізніше = 5 капсул на день

Вага дитини >45 кг

20 Тиждень 1=1 капсула два рази на день (BID)

Тижні 2&3=2 капсули два рази на день (BID)

Тижні 4&5=3 капсули два рази на день (BID)

Тижні 6&7=4 капсули два рази на день (BID)

Тижні 8 і пізніше = доза 5 капсул два рази на день (BID).

25 Щонайменше один антибіотик можна комбінувати з речовиною, яка сприяє всмоктуванню, яке може збільшувати біодоступність вказаного антибіотика. Кількість речовини, яка сприяє всмоктуванню, може становити 300-700 % мас./мас. відносно кількості антибіотика. У певних варіантах здійснення речовина, яка сприяє всмоктуванню, являє собою поліетиленгліколь. В одному прикладі поліетиленгліколь має середню молекулярну масу 200-20000 (наприклад, 30 1000-15000, 5000-12000, 7000-9000 або 7500-8500).

У іншому варіанті здійснення спосіб створення даних композицій включає диспергування щонайменше вказаного клофазиміну в PEG з утворенням дисперсії PEG/клофазимін і подальше змішування вказаної дисперсії PEG/клофазимін щонайменше з одним із вказаних інших антибіотичних засобів. У одному варіанті здійснення дисперсію PEG/клофазимін змішують із 35 кларитроміцином і рифабутином. Аналогічно кларитроміцин або рифабутин спочатку можна диспергувати в PEG і потім змішати з іншими антибіотиками.

Дані композиції можуть також містити вітамін. У певному варіанті здійснення дані композиції містять вітамін D.

40 Дані композиції можуть також містити протизапальний засіб. Протизапальний засіб може включати 5-аміносаліцилову кислоту. Альтернативно протизапальний засіб може включати азатіопрін. Інший протизапальний засіб може включати метотрексат.

Дані композиції також можуть містити інгібітор циклінальної кінази. Приклад включає R-росковітин. Інший приклад включає флавопіридол.

45 Крім того, дані композиції можуть включати інгібітор транскрипції в активованих Т-клітинах. Приклад включає такролімус.

Виявили, що у пацієнтів з РС спостерігаються підвищені імунологічні і цитокінові значення, що відповідають значенням, які спостерігаються при хронічних інфекціях. Дане розкриття стосується використання імуномодуляторних властивостей антибіотиків як одного терапевтичного підходу для зменшення запальної реакції у хазяїна, особливо у випадках 50 аутоімунних відповідей з метою лікування аутоімунних захворювань.

Бактеріолітичні антибіотики, такі, як β -лактами, діють шляхом інгібування синтезу клітинної стінки бактерій, що приводить до лізису патогену і, отже, до вивільнення прозапальних бактеріальних компонентів, що приводить до збільшення смертності і ускладнень. На відміну від них, бактерицидні антибіотики, такі, як рифабутин, запобігають початковому запальному 55 сплеску. Результати, отримані in vitro, дозволяють передбачити, що терапія небактеріолітичними антибіотиками спричиняє менш інтенсивне запалення і може поліпшити результат тяжких інфекцій.

Макролідні антибіотики мають чудову імуномодулюючу дію. Кларитроміцин зменшує життєздатність бактерій, яка корелює зі зниженням синтезу бактеріальних білків, що показано за допомогою внутрішньоклітинного накопичення, яке оцінюється в динаміці за часом при ряді бактеріальних інфекцій. Макроліди, такі, як кларитроміцин, інгібують синтез активних форм кисню і/або секрецію прозапальних цитокінів *in vitro*, в той же час, здійснюючи різні ефекти на вивільнення прозапальних цитокінів. Вивчали роль запальних цитокінів у запальних захворюваннях людини і оцінювали ефекти комбінації антибіотиків на рівні цитокінових білків.

Як відмічали раніше, розсіяний склероз являє собою аутоімунне захворювання, яке приводить до пошкодження мієлінової оболонки, яка оточує нейрони в головному і спинному мозку. Захворювання торкається руху, чутливості і фізичних функцій, і характеризується інфільтрацією запальних клітин у ЦНС. Етіологія включає комбінацію генетичних і зовнішніх чинників. Хоч необхідні подальші дослідження патогенезу захворювання, видно, вірусні і/або мікробні інфекції беруть участь в розвитку захворювання. Звичайно захворювання вражає молодих людей, жінок і європейців північноєвропейського походження.

При розсіяному склерозі білки класу II головного комплексу гістосумісності (МНС), експресовані на поверхні антигенпрезентуючих клітин, зв'язуються з мієліновими білками або спорідненими мієліновими білками, примушуючи клітини Th0 здійснювати активацію і диференціювання. Потім клітини Th1 проходять через гематоенцефалічний бар'єр в ЦНС, утворюють комплекси антиген-МНС і продукують прозапальні цитокіни.

Експериментальний аутоімунний енцефаломієліт (ЕАЕ) є мишачою моделлю розсіяного склерозу людини (РС), що звичайно використовується. Завдяки багатьом схожим із РС елементам ЕАЕ використовують для вивчення патогенезу аутоімунної реакції, запалення ЦНС, демієлінізації, переміщення клітин і індукції толерантності.

Нещодавно проведене дослідження з використанням тваринних моделей ЕАЕ вказує на роль прозапального каскаду з клітин Th17, IL-6 і TGF- β в центральній нервовій системі в патогенезі ЕАЕ і РС. ЕАЕ має схожість клінічних і патологічних виявів із РС. Модель ЕАЕ є головною при визначенні терапевтичних видів лікування (валідність мішені, оцінка потенційних ліків-кандидатів, прискорений режим дослідження, аналіз гістопатології).

ПРИКЛАД 1. Експеримент з визначенням рівнів цитокінів

Мишача модель - імунізація MOG₃₅₋₅₅/CFA

Метою даного дослідження було визначення ефектів композиції, яка містить рифабутин, кларитроміцин і клофазимін, яка надалі означається як препарат RHB-104, на продукцію цитокінів Т-лімфоцитами з дренажальних лімфатичних вузлів і селезінки після імунізації MOG₃₅₋₅₅/CFA.

Капсули RHB-104 включають 10 мг клофазиміну, 95 мг кларитроміцину і 45 мг рифабутину, і також різні допоміжні речовини.

Варіант здійснення композиції, що використовується в даному дослідженні і означається як RHB-104, представлений нижче.

Склад капсул RHB-104

інгредієнт (марка)	функція	мг на капсулу	%
клофазимін (USP/Ph.Eur.)	діюча речовина	10.00	3.23
рифабутин (USP/Ph.Eur.)	діюча речовина	45.00	14.53
кларитроміцин (USP/Ph.Eur.)	діюча речовина	95.00	30.67
поліетиленгліколь 8000 (NF/Ph.Eur.)	диспергувальна речовина	50.00	16.14
полісорбат 80 (NF/Ph.Eur.)	змочувальна речовина	6.66	2.15
мікрокристалічна целюлоза 200 (NF/Ph.Eur.)	розбавляюча речовина	28.00	9.04
стеарат магнію, рослинний клас (NF/Ph.Eur.)	лубрикант	4.68	1.51
лаурилсульфат натрію (NF/Ph.Eur.)	змочувальна речовина	10.00	3.23
мікрокристалічна целюлоза 200	розбавляюча речовина	60.42	19.51
тверда желатинова капсула (Mfg. Std)	-	1 одиниця	-
загалом		309.76	100

Дизайн експерименту

Створювали 3 експериментальні групи, що складаються з 4 мишей/групу.

Захворювання викликали, імунізуючи мишей в день 0 мієлін-олігодендроцитарним глікопротеїном, пептидом 33-55 (MOG₃₅₋₅₅), емульгованим у повному ад'юванті Фрейнда (CFA), і починали лікування в той же день. Через одинадцять днів мишей умертвляли, виділяли селезінку і лімфовузли, готували клітинні суспензії. Клітинні суспензії культивували протягом 3 днів у присутності різних концентрацій MOG₃₅₋₅₅. Збирали культуральні супернатанти по закінченні вказаного 3-денного періоду культивування. Концентрації 7 цитокінів (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF-альфа і IFN-гамма) визначали в культуральних супернатантах із використанням наборів для детекції цитокінів Th1/Th2/Th17 Cytokine Bead Assay (CBA) від Becton Dickinson.

Миші та імунізація

У дослідженні використали загалом 12 самок мишей C57BL/6 (Taconic Farms, у віці 14 тижнів).

У день 0 мишей імунізували шляхом введення MOG₃₅₋₅₅/CFA в дві ділянки на спині, s. c.

Групи і лікування

Лікування починали в день 0 (день імунізації) і продовжували до виведення тварин з експерименту в день 11.

Група 1 - носій, 10 мл/кг, p. o., BID (негативний контроль)

Група 2-RHB-104, 36 мг/кг, p. o., BID, 10 мл/кг

Група 3-RHB-104, 36 мг/кг, p. o., QD, 10 мл/кг

Дозування AM: RHB-104, 36 мг/кг, p. o., QD, 10 мл/кг

Дозування PM: носій, QD, 10 мл/кг (контроль для обліку стресу при введенні препарату)

Введення всіх доз здійснювали в один і той же час (+/- 1 година) кожний день. Інтервал між введенням доз вранці і увечері складав щонайменше 10 годин і між введенням доз увечері і вранці не більше 14 годин.

Всіх мишей умертвляли через 1-4 години після введення ранкової дози в день 11.

Культури клітин селезінки і лімфатичних вузлів

Отримували селезінки від всіх мишей, об'єднували в кожній групі і отримували клітинні суспензії.

Отримували пахові лімфовузли всіх мишей, об'єднували для кожної групи і готували клітинні суспензії.

З кожної клітинної суспензії створювали культури в 96-ямкових планшетах з використанням MOG₃₅₋₅₅ в п'яти концентраціях: MOG₃₅₋₅₅ відсутній, 0,7, 2,2, 6,7, і 20,0 мкг/мл MOG₃₅₋₅₅, всі концентрації використовували в трьох екземплярах.

Супернатанти збирали через 72 години культивування.

Концентрації цитокінів у кожній культурі визначали з використанням набору CBA Th1/Th2/Th17 (набір Mouse Th1/Th2/Th17 BD™ Cytometric Bead Array (CBA), Becton Dickinson). Вказаний набір дозволяє провести одночасне вимірювання концентрацій 7 різних цитокінів (IL-10, IL-4, IL-2, IL-17A, IFN-γ, TNF-альфа, IL-6).

Результати

1) Цитокін IL-10

Рівні IL-10 знаходилися нижче стандартного діапазону визначення, тому які-небудь зміни не могли бути виявлені.

2) Цитокін IL-17 A

При введенні дози RHB-104 BID спостерігали зниження рівнів цитокінів у лімфовузлах і в меншому ступені в селезінці, як видно на фіг. 1.

3) Цитокін TNF-альфа

Введення доз RHB-104 BID і QD знижувало рівень TNF-альфа в селезінці. Крім того, введення доз BID зменшувало TNF-альфа в лімфовузлах. Зниження рівня TNF-альфа в селезінці при введенні доз BID становило майже 50 %, як показано на фіг. 2.

4) Цитокін IFN-гамма

RHB-104 знижував IFN-гамма при введенні дози BID в селезінці, як показано на фіг. 3.

5) Цитокін IL-6

При введенні дози RHB-104 BID спостерігали майже 50 % зменшення IL-6 в селезінці, як показано на фіг. 4.

Цитокін IL-4

Значення IL-4 знаходилися нижче стандартного діапазону визначення.

7) Цитокін IL-2

RHB-104 знижував IL-2 при введенні дози QD як в селезінці, так і в лімфовузлах, як показано на фіг. 5.

Ефект препарату RHB-104, що містить рифабутин, кларитроміцин і клофазимін, на рівні цитокінів у вказаній вище мишачій моделі підтверджений подальшим аналізом у мишачій моделі EAE, яка є широко відомою моделлю РС людини.

Експеримент 2. Оцінка ефективності RHB-104 при введенні в мишачій моделі EAE.

Попередня інформація і опис моделі EAE

Індукція EAE

Хронічний EAE розвивається у мишей C57BL/6 після імунізації емульсією MOG₃₅₋₅₅/CFA або MOG₁₋₁₂₅/CFA з подальшою ін'єкцією коклюшного токсину. Вказану модель використовують для перевірки ефективності сполук, призначених для запобігання або ослаблення захворювання EAE. Модель можна здійснити з використанням сполуки, яку вводять із моменту імунізації (профілактичне лікування), або з метою викликати зворотний розвиток захворювання і полегшити відновлення шляхом введення доз сполуки з моменту настання EAE (терапевтичне лікування).

У моделі використовують самок мишей C57BL/6 у віці 10-14 тижнів на початку захворювання. Звичайно розвивається через 8-18 днів після імунізації. Розвиток EAE звичайно протікає протягом 4 тижнів (28 днів) після імунізації.

Стрес знижує у мишей схильність до EAE. Незалежно від ефектів будь-якої сполуки, введення препарату під час періоду індукції захворювання (~0-10 днів після імунізації) відсуває настання захворювання і зменшує тяжкість захворювання. Даний факт пов'язаний зі стресом, викликаним введенням препарату, і з ефектами, які здійснює носій на мишу. Що частіше проводять введення і що менш переносимий носій використовують, то більший вплив виявляється на розвиток захворювання.

Стрес, пов'язаний з лікуванням і введенням носія, здійснює значно менший ефект на розвиток захворювання після появи клінічних ознак EAE.

Профілактичне лікування

У дослідженнях, пов'язаних із профілактичним застосуванням препарату, лікування починали до настання захворювання, під час імунізації і розподілу по групах. Мишей розподіляють по групах лікування збалансованим чином, щоб створити групи зі схожими розподілами значень маси тіла мишей.

У дослідженнях профілактичного застосування препарату оцінюють, чи буде лікування здійснювати ефект на протікання захворювання до і після появи перших клінічних ознак EAE.

Щоб компенсувати стрес, викликаний лікуванням, у дослідженнях профілактичного лікування і досягнути заданої тяжкості захворювання, EAE індують за допомогою більш високої дози коклюшного токсину, ніж доза, що застосовується в терапевтичних дослідженнях. Дозу коклюшного токсину визначають виходячи з очікуваного стресу, викликаного введенням дози (шлях, частота введення і склад носія).

У дослідженнях, пов'язаних із профілактичним застосуванням препарату, середній час до настання захворювання є найбільш чутливим показником ефективності сполуки.

Невеликі зміни імунної відповіді можуть приводити до відстроченого початку захворювання - супресія Т-клітинної активації і проліферації, презентація антигена, диференціювання в клітини Th1 і/або Th17 будуть приводити до відстроченого початку EAE.

Відстрочений початок EAE, що супроводжується більш низьким показником максимальної тяжкості захворювання, свідчить про загальну ефективність лікування, порівняно з групою негативного контролю.

Терапевтичне лікування

У дослідженнях, пов'язаних із терапевтичним лікуванням, лікування починали під час початку EAE. Мишей розподіляють в різні групи лікування в міру того, як у них розвивається EAE (змінне включення) збалансованим чином, для отримання груп зі схожим часом маніфістації EAE і схожими показниками при появі захворювання.

У терапевтичних дослідженнях визначають, чи буде лікарський препарат сприяти усуненню захворювання або сприяти відновленню після EAE.

Найбільш важливим показником в даній моделі є середній показник клінічного закінчення EAE. Даний показник являє собою клінічний результат експерименту; зниження показника порівняно з групою негативного контролю свідчить про ефективність лікування.

Розвиток EAE у мишей, які не отримували лікування

Протікання захворювання буде відрізнятися у окремих мишей. У більшості мишей початкові ознаки EAE з'являються між 9 і 14 днями після імунізації. Після початку EAE пік захворювання майже завжди настає через 3-4 дні. Максимально значення оцінки захворювання за шкалою в

балах зберігається протягом декількох днів і потім миші частково видужують. У деяких мишей максимально тяжкий ступінь захворювання зберігається до закінчення дослідження. Рідше у миші пік тяжкості захворювання зберігається тільки протягом одного дня, і потім починається одужання.

5 Ступінь відновлення залежить, головним чином, від максимальної тяжкості захворювання, що спостерігається у миші. Більшість мишей, які не отримували лікування або які отримували носій, не відновлюються повністю, але їх заключна оцінка звичайно на 0,5-1,5 балів нижча, ніж максимальна оцінка, що спостерігається у них. Приблизно у 25 % мишей, які не отримували лікування або які отримували носій, спостерігають погіршення EAE між 24 і 28 днями після імунізації, що нагадує рецидив. У спинному мозку у даних мишей у час погіршення EAE виявляють велику кількість вогнищ запалення (>7 вогнищ у зрізі), що відповідає результатам гістологічного дослідження, які отримуються під час маніфестації і піка EAE, що дозволяє передбачити, що у вказаних мишей відбуваються істинні рецидиви захворювання з новою хвилею запалення в спинному мозку.

15 При спостереженні за мишами протягом більш тривалого періоду часу тяжкість захворювання повільно зростає, що нагадує хронічне прогресуюче протікання захворювання у пацієнтів з РС.

20 Під час протікання EAE зміни маси тіла відображають тяжкість захворювання. У мишей часто спостерігається невелике зниження маси на наступний день після імунізації. Вказане зниження, мабуть, викликане ефектами введеного ад'юванта і коклюшного токсину. Потім маса мишей неухильно зростала до початку захворювання. У день маніфестації EAE миші обов'язково втрачали 1-2 г своєї маси (5-10 % маси тіла). Втрата маси продовжується при прогресуванні тяжкості захворювання EAE, при цьому втрата маси на пікові захворювання досягає приблизно 20 % від початкової маси. Зниження маси відбувається, швидше за все, внаслідок паралічу і зниження споживання їжі, а також високої продукції прозапальних цитокінів, таких, як TNF, під час гострої фази запалення. Після досягнення піка захворювання у мишей повільно збільшується маса, навіть якщо їхні клінічні показники не поліпшуються. Вказане збільшення маси може бути викликане пригніченням запалення, що приводить до більш низьких рівнів прозапальних цитокінів у крові. У мишей, які не отримували лікування або які отримували носій, через 28 днів після імунізації маса тіла звичайно становить приблизно 90 % від маси тіла до імунізації.

Гістологія

Запалення при EAE звичайно починається в поперековій області спинного мозку, розповсюджуючись на весь спинний мозок при пікові захворювання.

35 На початку захворювання кількість вогнищ запалення суворо корелює з тяжкістю захворювання. Кількість вогнищ зростає до настання піка захворювання, коли виявляють звичайно 6-15 вогнищ запалення/препарат по всьому спинному мозку. При хронічній стадії EAE (яка починається через декілька днів після піка захворювання) багато запальних вогнищ розсмоктується, звичайно приводячи до утворення 3-4 вогнищ запалення в кожному препараті спинного мозку приблизно до 28-го дня після імунізації.

40 Оскільки найбільші кількості вогнищ запалення представлені на початку протікання захворювання, якщо гістологічний аналіз виконують при закінченні дослідження, у мишей, які характеризуються пізньою маніфестацією EAE, часто виявляють більше вогнищ запалення в спинному мозку, ніж можна було би чекати, виходячи з їхніх клінічних показників. Наприклад, на 45 28-й день дослідження миша з маніфестацією EAE на 27-й день після імунізації і заключною клінічною оцінкою 2, ймовірно, буде мати більше вогнищ запалення, ніж миша з маніфестацією EAE через 9 днів після імунізації і заключною оцінкою 3,5. Аналогічно у миші, що перенесла рецидив незадовго до закінчення дослідження (рецидив визначають, як збільшення клінічної оцінки на 1 або більше бали), як правило, будуть визначати більше вогнищ запалення при 50 закінченні дослідження, ніж у миші зі стійким хронічним захворюванням, навіть якщо обидві миші мали однаковий клінічний показник в балах при закінченні дослідження.

Демієлінізацію звичайно не виявляють протягом перших двох днів після початку захворювання, але виявляють на пікові захворювання (через 4-5 днів після маніфестації EAE) і вона зберігається під час хронічної фази EAE. Показники демієлінізації трохи змінюються між піком і 28-м днем після імунізації і звичайно складають в середньому від 1,2 до 2,5.

Демієлінізацію оцінюють у препаратах, забарвлених як люксомом швидким блакитним (LFB), так і H&E.

У препаратах LFB біла речовина спинного мозку забарвлюється в темно-блакитний колір, і ділянки демієлінізації забарвлюються в більш світлий блакитний колір і асоціюються з великими вакуолями.

У препаратах, забарвлених Н&Е, пошкодження нормальної структури за рахунок великих вакуолей свідчить про демієлінізацію.

Апоптотичні клітини виявляють в препаратах Н&Е, і звичайно не виявляють протягом перших двох днів розвитку захворювання. Їх виявляють на пікові і під час хронічної стадії ЕАЕ.

5 Середня кількість апоптотичних клітин звичайно складає від 2 до 4 в препараті.

Дизайн експерименту

Мишей зважували перед початком дослідження і потім розподіляли по групах і збалансованим чином. Лікування сполукою починали в день імунізації (день 0 дослідження).

10 Захворювання викликали шляхом імунізації мишей в день 0 мієліновим олігодендроцитарним глікопротеїном, пептидом 35-55 (MOG₃₅₋₅₅), емульгованим в повному ад'юванті Фрейнда (CFA), з подальшим введенням двох ін'єкцій коклюшного токсину (введеними в дні 0 і 1).

15 Для оцінки розвитку захворювання мишей зважували три рази на тиждень (в понеділок, середу і п'ятницю) з моменту імунізації і щодня проводили оцінку в балах клінічних ознак ЕАЕ, починаючи з 7-го дня.

Матеріали і методи

Миші

У дослідженні використали загалом 24 самки мишей C57BL/6 (Taconic FarPC, у віці 10 тижнів).

20 Групи і лікування

Мишей розподіляли по групах рівномірним чином для досягнення схожого показника маси мишей в групах на початку дослідження.

У таблиці 1 нижче показано, який препарат вводили кожній групі.

Таблиця 1

Імунізація і схема лікування

Група	Сполука	Доза	Частота введення	Мета
1	носій	-	BID	Негативний контроль
2	RHB-104	36 мг/кг	BID	Тестована сполука

25

Кожна група складалася з 12 мишей.

Лікування у всіх групах здійснювали р. о., BID в об'ємі 10 мл/кг.

Лікування починали в день імунізації (день 0) і продовжували до 27-го дня після імунізації. Введення всіх доз здійснювали в один і той же час (+/- 1 година), кожний день. Інтервал між введенням доз увечері і вранці складав щонайменше 14 годин і між введенням доз вранці і увечері не більше 10 годин.

30

Індукція ЕАЕ

ЕАЕ викликали у 24 самок мишей C57BL/6 (у віці 10 тижнів), як зазначено нижче:

35

День 0, година 0 - імунізація MOG₃₅₋₅₅/CFA

День 0, година 2 - ін'єкція коклюшного токсину

День 1, година 0-2-а ін'єкція коклюшного токсину (24 години після первинної імунізації)

40 Мишам вводили ін'єкцію модифікованого компонента емульсії з набору (що містить MOG₃₅₋₅₅) підшкірно в дві ділянки на спині. Одне місце ін'єкції знаходилося в області верхньої частини спини, приблизно на 1 см нижче за лінію шиї. Друга ділянка знаходилася в області нижньої частини спини, приблизно на 2 см вище основи хвоста. Об'єм ін'єкції становив 0,1 мл для кожної ділянки.

Протягом 2 годин після ін'єкції емульсії і потім повторно через 24 години після ін'єкції емульсії компонент коклюшного токсину з набору вводили внутрішньочеревно. Об'єм кожної ін'єкції становив 0,1 мл.

45

Підрахунок балів і показники

Показники являли собою оцінки ЕАЕ і значення маси при закінченні дослідження.

Оцінку показників у балах у мишей проводили щодня з 7-го дня і до закінчення дослідження, і масу тіла вимірювали три рази/тиждень (понеділок, серeda і п'ятниця), починаючи з дня 1.

Останнім днем проведення оцінки був 28-й день після імунізації.

50

Оцінку здійснювали сліпим методом із залученням суб'єкта, який не знає про лікування і про попередні оцінки для кожної миші.

Оцінка ЕАЕ

ЕАЕ оцінювали за шкалою від 0 до 5:

Оцінка 0.

У миші відсутні очевидні зміни моторних функцій порівняно з неімунізованими мишами.

При піднятті миші за хвіст, хвіст є пружним і випрямляється. Задні лапи звичайно направлені в різні сторони.

5 При рухові миші не спостерігається порушення ходи і похитування голови.

Оцінка 1.

Звисаючий хвіст.

Коли мишу підіймають за хвіст, хвіст не випрямляється, а повністю звішується вище пальця.

Оцінка 2.

10 Звисаючий хвіст і слабкість задніх кінцівок.

Коли мишу підіймають за хвіст, вона не розводить лапи в сторони, а підтискає їх разом. При спостереженні за рухами миші виразно видно нестійку ходу.

Оцінка 3.

Звисаючий хвіст і повний параліч задніх кінцівок (найчастіше); або

15 Звисаючий хвіст в поєднанні з паралічем однієї передньої лапи і однієї задньої лапи; або все з перерахованого:

виражене хитання голови,

переміщення тільки вздовж стінок клітки,

припадання до стінки клітки,

20 обертання при піднятті за хвіст.

Оцінка 4.

Звисаючий хвіст, повний параліч задніх лап і частковий параліч передніх лап.

Миша мінімально переміщається по клітці, але виглядає настороженою і приймає їжу.

Звичайно рекомендують проводити евтаназію після того, як у миші отримують рівень оцінок 4 протягом 2 днів. Коли мишу піддають евтаназії через тяжкий параліч, такій миші потрібно привласнювати оцінку 5 під час іншої частини експерименту.

Оцінка 5.

Повний параліч задніх і передніх лап, відсутнє переміщення по клітці; або

миша спонтанно крутиться в клітці; або

30 виявляють мишу, яка загинула від паралічу.

Проміжні оцінки привласнюють, якщо клінічні ознаки розташовані між двома вказаними вище оцінками.

Гістологічний аналіз препаратів спинного мозку

35 У день 28 (закінчення дослідження) всіх мишей умертвляли для проведення гістологічного аналізу.

Мишей перфузували PBS і вміщували спинний мозок в 10 % буферний розчин формаліну.

Для кожної миші отримували 3 препарати, забарвлені люксолом швидким блакитним, і 3 препарати, забарвлені H&E, з люмбального, торакального і цервікального відділу спинного мозку, і проводили аналіз. Гістологічний аналіз здійснював патолог, який не мав інформації про експериментальні групи і всі клінічні показники.

40

Підрахунок вогнищ запалення

Підраховували вогнища запалення приблизно для 20 клітин в кожному препараті, забарвленому H&E. Якщо запальні інфільтрати склалися більш ніж з 20 клітин, здійснювали підрахунок кількості вогнищ, представлених в 20 клітинах.

45 Оцінка демієлінізованої ділянки

Оцінка демієлінізації являє собою визначення демієлінізованої ділянки для кожного зрізу, як вказано нижче:

0 - відсутність демієлінізації (менше, ніж 5 % демієлінізованої ділянки)

1-5-20 % демієлінізованої ділянки

50 2-20-40 % демієлінізованої ділянки

3-40-60 % демієлінізованої ділянки

4-60-80 % демієлінізованої ділянки

5-80-100 % демієлінізованої ділянки

55 У випадку препаратів, забарвлених люксолом швидким блакитним, розмір ділянки демієлінізації визначали на основі менш інтенсивного блакитного забарвлення мієліну.

У випадку препаратів, забарвлених H&E ділянку демієлінізації оцінювали шляхом пошуку порушення нормальної структури - блідості і вакуолізації, що вказують на набряк і демієлінізацію, і збільшених аксонів.

Підрахунок апоптотичних клітин

Визначали кількість апоптотичних клітин у кожному із трьох препаратів, забарвлених Н&Е. Апоптотичні клітини являють собою нейрони, і їхня кількість корелює зі стадіями захворювання. Апоптотичні клітини з'являються незабаром після початку захворювання, так що при маніфістації ЕАЕ будуть присутні численні вогнища запалення, але незначна кількість апоптотичних клітин. Потім кількість апоптотичних клітин зростає до піка захворювання і залишається підвищеною надалі.

Статистичний аналіз

Статистичний аналіз здійснювали, як зазначено нижче.

Частоту виникнення захворювання порівнювали з використанням критерію хи-квадрат

Медіанний час маніфістації ЕАЕ порівнювали з використанням аналізу виживаності за критерієм Вілкоксона

Середній час маніфістації ЕАЕ порівнювали з використанням двостороннього критерію Стьюдента

Середню максимальну оцінку (МРС) порівнювали з використанням критерію суми рангів Вілкоксона

Заключну оцінку порівнювали з використанням критерію суми рангів Вілкоксона

Зміну маси тіла порівнювали з використанням двостороннього критерію Стьюдента

Оцінки демієлінізації (LFB) порівнювали з використанням непараметричного критерію Вілкоксона

Оцінки демієлінізації (Н&Е) порівнювали з використанням непараметричного критерію Вілкоксона

Кількість апоптотичних клітин порівнювали з використанням двостороннього критерію Стьюдента

Результати і інтерпретація даних

Розвиток ЕАЕ оцінювали шляхом порівняння наступних показників:

частота виникнення ЕАЕ, медіанний і середній час маніфістації ЕАЕ (ММЕ), середня максимальна оцінка (МРС), середні оцінки ЕАЕ при закінченні дослідження, і середній показник маси тіла при закінченні дослідження порівняно з початковою масою між групою, яка отримувала носій (негативний контроль), і групою RHB-104.

Висновок про результати - клінічні дані

Таблиця 2

лікування	Частота виникнення ЕАЕ (%)	р значення	ММЕ	р значення	МРС +/- SD	р значення	Заключна оцінка +/- SD	р значення	Маса тіла в кінці дослідження +/- SD	р значення
носії	100.0%		15.0		3.08 +/- 0.87		2.54 +/- 1.05		90.7 +/- 7.5	
RHB-104	100.0%	1.0000	15.0	0.7617	2.33 +/- 0.65	0.0031	0.92 +/- 0.67	0.0011	105.2 +/- 3.8	0.0000

Група 1: група, яка отримувала носій, р. о., BID (негативний контроль)

У більшості мишей даної групи розвивався тяжкий ЕАЕ (таблиця 1 і фіг. 6).

У більшості мишей даної групи відмічали втрату маси під час дослідження, яка була очікуваною (таблиця 1 і фіг. 7).

У даній групі не спостерігали загибелі мишей.

Група 2: RHB-104, 36 мг/кг, р. о., BID

У більшості мишей в даній групі захворювання розвивалося в більш легкій формі, ніж спостерігали в групі, яка одержувала носій.

У даній групі спостерігали істотне поліпшення більшості клінічних показників ЕАЕ, порівняно з групою, яка одержувала носій (таблиця 1 і фіг. 6 і 7).

У даній групі не спостерігали загибелі мишей.

Наведені вище результати свідчать про виражений ефект відносно тяжкості захворювання, відповідно до вказаних вище показників при лікуванні RHB-104, порівняно з контролем, в прийнятій мишачій моделі РС людини.

Результати - Дані гістологічного дослідження

Таблиця 3

лікування	Вогнища запалення +/- SD	p значен- ня	Демієлінізація (LFB) +/- SD	p значення	Демієлінізація (H&E) +/- SD	p значення	Апоптотичні клітини +/- SD	p значен- ня
носій	3.2 +/- 2.2		1.7 +/- 0.7		1.4 +/- 0.6		3.1 +/- 1.2	
RHB-104	1.8 +/- 1.6	0.0867	0.6 +/- 0.6	0.0018	0.8 +/- 0.5	0.0198	1.4 +/- 1.7	0.0093

Миші, які отримували носій

Дані гістологічного дослідження мишей, які отримували носій, були типовими для даної стадії і ступеню тяжкості ЕАЕ. Отримані при невеликому збільшенні зображення характерних зрізів торокального і люмбального відділів спинного мозку мишей, які отримували носій, показали, що запалення було представлене в м'якій і павутинній оболонках мозку і в білій речовині мозку. У даній групі не було загинувших мишей.

Миші, які отримували RHB 104

Відповідно до клінічних даних більшість гістологічних показників у даних мишей вказували на істотно менш тяжкий ступінь захворювання, ніж у мишей, які отримували носій. На отриманих при невеликому збільшенні зображеннях характерних зрізів торокального і люмбального відділів спинного мозку мишей, які отримували RHB-104, виявили меншу кількість вогнищ запалення у вказаних препаратах, ніж у препаратах, отриманих від мишей, які отримували носій. Крім того, вогнища запалення були менші у мишей групи RHB-104, ніж у мишей, які отримували носій.

Ділянки демієлінізації були істотно менші у мишей групи RHB-104, ніж у мишей, що отримували носій. У даній групі не було загинувших мишей.

Середня кількість вогнищ запалення, виявлених у препаратах, забарвлених H&E, представлена на фіг. 8 і середня оцінка демієлінізації на основі препаратів, забарвлених люксомом швидким блакитним, показана на фіг. 9.

Гістологічні показники, які узгоджуються з клінічними даними, вказували на істотно менш тяжку форму захворювання у мишей даної групи, ніж у мишей, які отримували носій. У препаратах мишей, які отримували RHB-104, виявляли менше вогнищ запалення, ніж у препаратах мишей, які отримували носій. Крім того, вогнища запалення були менші у мишей, які отримували RHB-104, ніж у мишей, які отримували носій.

Ділянки демієлінізації були значно менші у мишей, які отримували RHB-104, ніж у мишей, які отримували носій. Всі вказані результати підтверджують клінічне спостереження, що у мишей, які отримували RHB-104, спостерігали значно менш тяжку форму ЕАЕ, ніж у мишей, які отримували носій, в кінці дослідження із застосуванням мишачої моделі РС.

Експеримент 3. Дослідження рецидиву ЕАЕ.

Модель має найбільш сильну схожість із рецидивуюче-ремітуючою формою РС (найпоширеніша форма РС).

Як кратну інформацію про модель, потрібно розуміти, що перший епізод паралічу розвивається у мишей через 11-14 днів після імунізації в моделі ЕАЕ і, аналогічно більшості пацієнтів РС, вони повністю або майже повністю відновлюються після першої хвилі паралічу. Після безрецидивного періоду тривалістю 1-2 тижні у 50-100 % мишей розвивається друга хвиля паралічу (рецидив).

Вказану модель використовують для перевірки дії сполук на вияв рецидивів ЕАЕ (терапевтичне лікування). Лікування можна починати при появі клінічних ознак ЕАЕ або на початку відновлення після першої хвилі ЕАЕ. Вказану модель звичайно здійснюють протягом 5-7 тижнів, але іноді спостереження за мишами проводять протягом більш тривалого часу.

Дизайн експерименту

Захворювання викликали шляхом імунізації мишей в день 0 пептидом PLP₁₃₉₋₁₅₁, емульгованим у повному ад'юванті Фрейнда (CFA).

Щоб оцінити розвиток захворювання, мишей зважували три рази на тиждень (понеділок, середа і п'ятниця), починаючи від моменту імунізації, і проводили щоденне визначення в балах клінічних ознак ЕАЕ, починаючи з 9-го дня.

Включення мишей в групи дослідження здійснювали на другий день появи клінічних ознак ЕАЕ для кожної миші. Мишей включали в групи лікування в міру того, як у них розвивалися ознаки ЕАЕ (змінне включення).

Розподіл по групах і лікування

5 Початково всіх мишей розглядали як одну групу. Щоденну оцінку в балах починали здійснювати на 9-й день після імунізації.

Включення мишей в групи дослідження здійснювали на другий день появи клінічних ознак ЕАЕ для кожної миші. Мишей включали в групи лікування в міру того, як у них розвивалися ознаки ЕАЕ (змінне включення).

10 Сорок п'ять мишей включали в 3 групи дослідження, по 15 мишей, і лікування починали в день включення в дослідження. Розподіл по групах був збалансованим для отримання схожих оцінок серед груп при включенні в дослідження.

Сім мишей, у яких захворювання розвинулося значно пізніше, або у яких спостерігали незвичайні симптоми, не включали в групи і не використовували в дослідженні.

15 Групи

Група 1 - носій (PBS), р. о., BID, 5 мл/кг (негативний контроль)

Група 2 - лікування FTY-720 (Fingolimod, Gilenya) 3 мг/кг, р. о., QD (ліки застосовували для лікування РС і використовували як позитивний контроль)

Група 3 - лікування RHB-104, р. о., BID, 5 мл/кг

20 Лікування

Лікування починали в день включення в дослідження і продовжували до 39-го дня.

Введення всіх доз здійснювали в один і той же час (+/- 1 година), кожний день. Інтервал між введенням ранкових і вечірніх доз складав щонайменше 10 годин і між введенням вечірніх і ранкових доз не більше 14 годин.

25 Для всіх мишей останнім днем введення доз був 39-й день.

Оцінка в балах і отримані дані

Оцінку показників у мишей проводили щодня з 9-го по 40-й день, і масу вимірювали три рази/тиждень (понеділок, середа і п'ятниця), починаючи до моменту проведення імунізації (Day-1).

30 Оцінку здійснювали сліпим методом, із залученням суб'єкта, який не знає про лікування і про попередні оцінки, отримані для кожної миші.

Показники являли собою оцінки ЕАЕ за шкалою 0-5 з кроком вимірювання 0,5 і значення змін маси тіла.

Оцінка в балах ЕАЕ

35 ЕАЕ оцінювали за шкалою від 0 до 5, як описано вище.

Статистичний аналіз

Статистичний аналіз здійснювали, як зазначено нижче:

Медіанний час маніфістації ЕАЕ порівнювали із застосуванням аналізу виживаності за критерієм Вілкоксона

40 Середній час маніфістації ЕАЕ порівнювали із застосуванням двостороннього критерію Стьюдента

Середню максимальну оцінку (МРС) першої хвили порівнювали із застосуванням критерію суми рангів Вілкоксона

Частоту виникнення рецидивів порівнювали із застосуванням критерію хи-квадрат

45 Середню максимальну оцінку (МРС) рецидиву порівнювали із застосуванням критерію суми рангів Вілкоксона

Заключну оцінку порівнювали із застосуванням критерію суми рангів Вілкоксона

Зміну маси тіла порівнювали із застосуванням двостороннього критерію Стьюдента

Результати

50 У 8 мишей в групі 1 спостерігали рецидив, відповідно до їх клінічних оцінок, тоді як тільки у 2 мишей з груп 2 і 3 відмічали рецидив.

Крім того, тяжкість рецидиву захворювання в групі 3 була значно менше виражена, ніж в групі 1, про що свідчить графік, представлений на фіг. 12.

Висновок

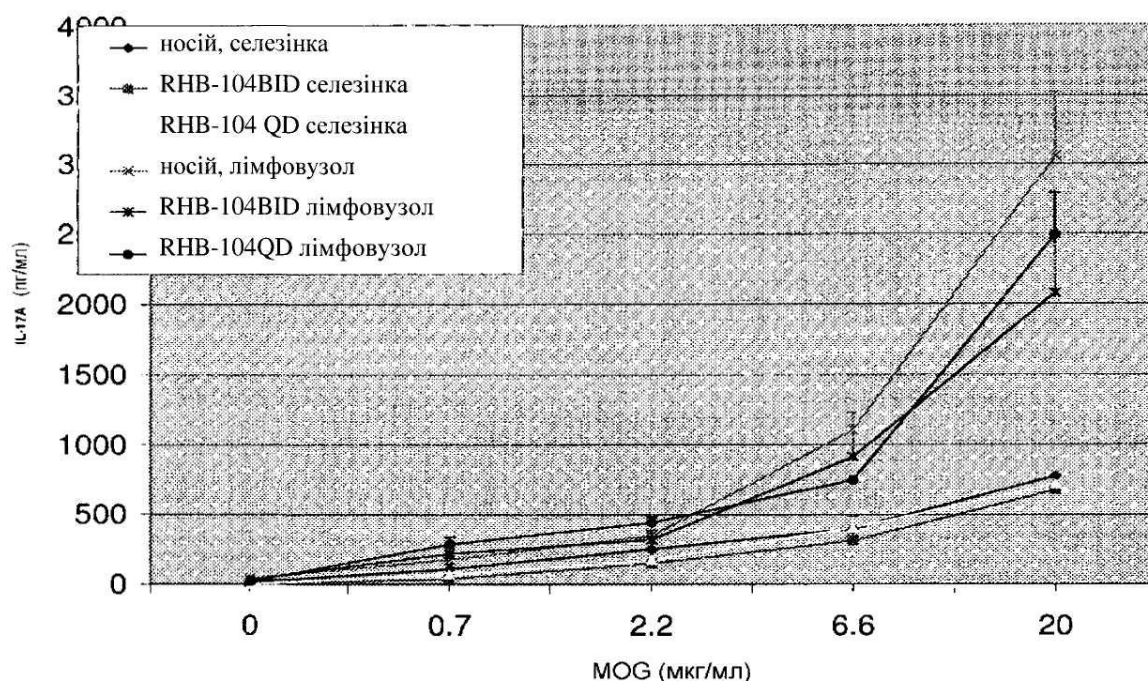
55 Крім зменшення симптомів при початковій появі ЕАЕ, показано, що дана композиція RHB-104 захищає від рецидиву захворювання в широко відомій мишачій моделі, що використовується, як вказано вище, і у випадках, коли відбувається рецидив, тяжкість захворювання істотно знижена, порівняно з групою негативного контролю. Результати, в сукупності, показують, що RHB-104 мав високу ефективність у зменшенні тяжкості
60 захворювання в даному дослідженні.

Фахівцям зрозуміло, що здійснені численні варіації і/або модифікації описаних вище варіантів здійснення, без порушення загального широкого об'єму даного розкриття. Тому дані варіанти здійснення потрібно розглядати у всіх відносинах, які є ілюстративними і не обмежують.

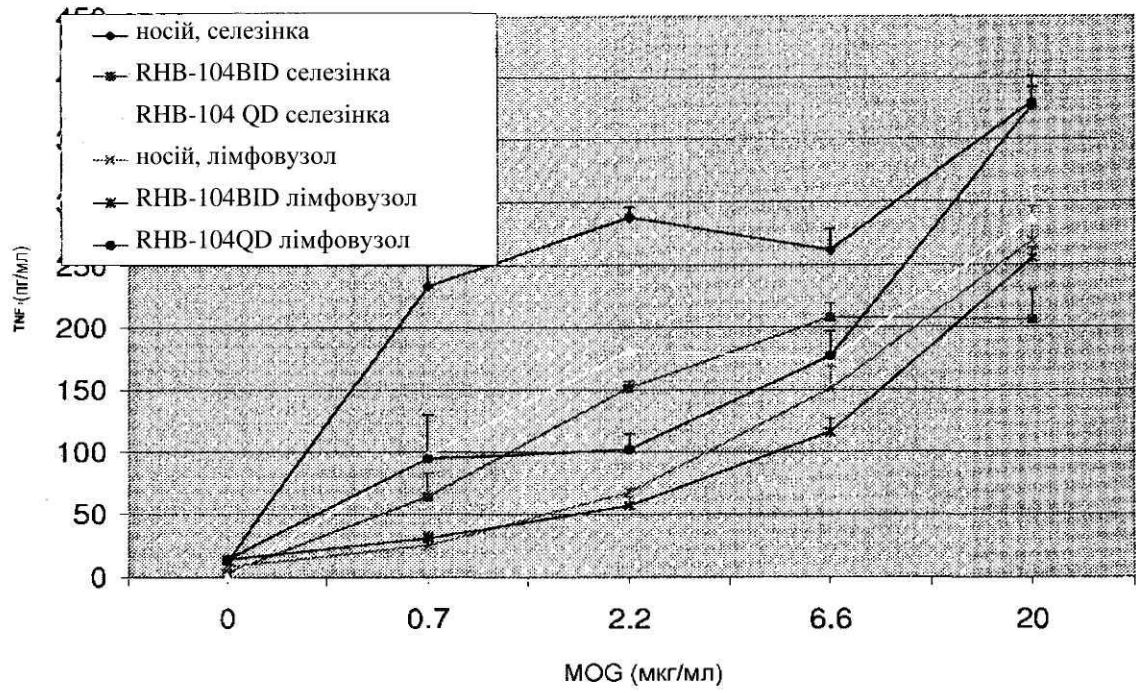
5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

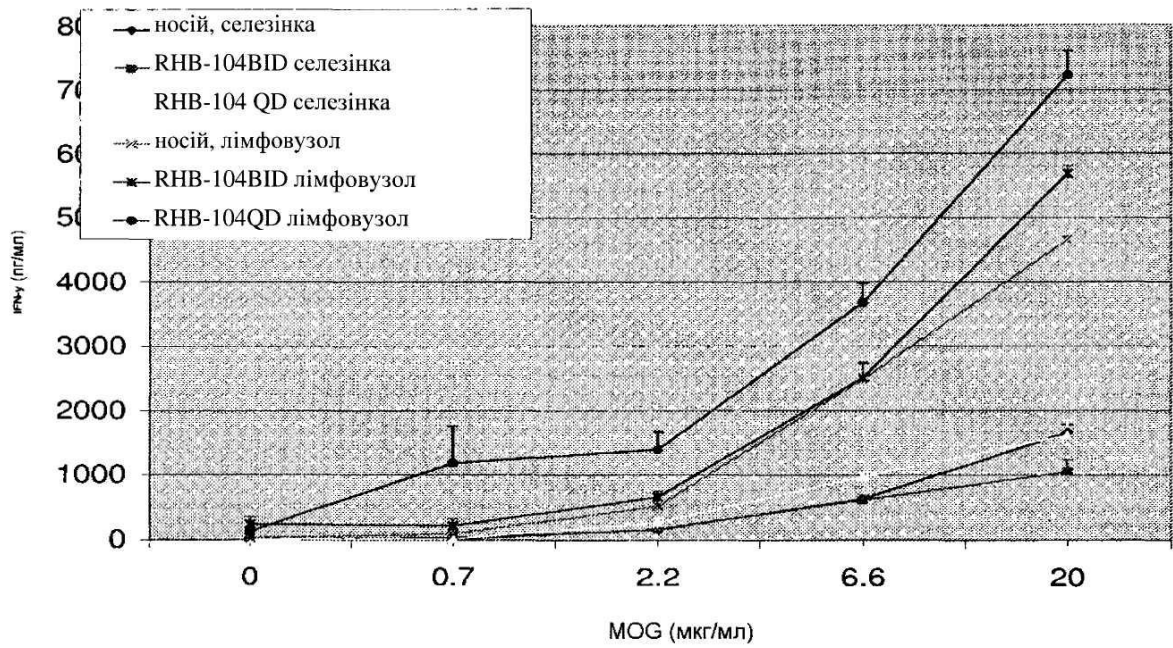
1. Застосування композиції, що містить кларитроміцин, рифабутин і клофазамін, для виготовлення лікарського засобу для лікування розсіяного склерозу.
- 10 2. Застосування композиції за п. 1, для лікування рецидивно-ремітуючого розсіяного склерозу.
3. Застосування композиції за п. 1, де композиція додатково містить вітамін D.
4. Застосування композиції за п. 1, де композиція додатково містить протизапальний засіб.
5. Застосування композиції за п. 1, де композиція додатково містить інгібітор циклінзалежної кінази.
- 15 6. Застосування композиції за п. 1, де композиція додатково містить інгібітор транскрипції в активованих Т-клітинах.
7. Застосування композиції за п. 1, де композиція складена для перорального введення.
8. Застосування композиції за п. 1, де клофазамін диспергований у підсилювачі всмоктування.
9. Застосування композиції за п. 1, де при введенні композиції суб'єкту з розсіяним склерозом спостерігається зменшення демієлінізації.
- 20 10. Застосування за п. 1, де при введенні композиції суб'єкту з розсіяним склерозом спостерігається щонайменше зменшення інтенсивності одного або більше симптомів, пов'язаних з розсіяним склерозом.



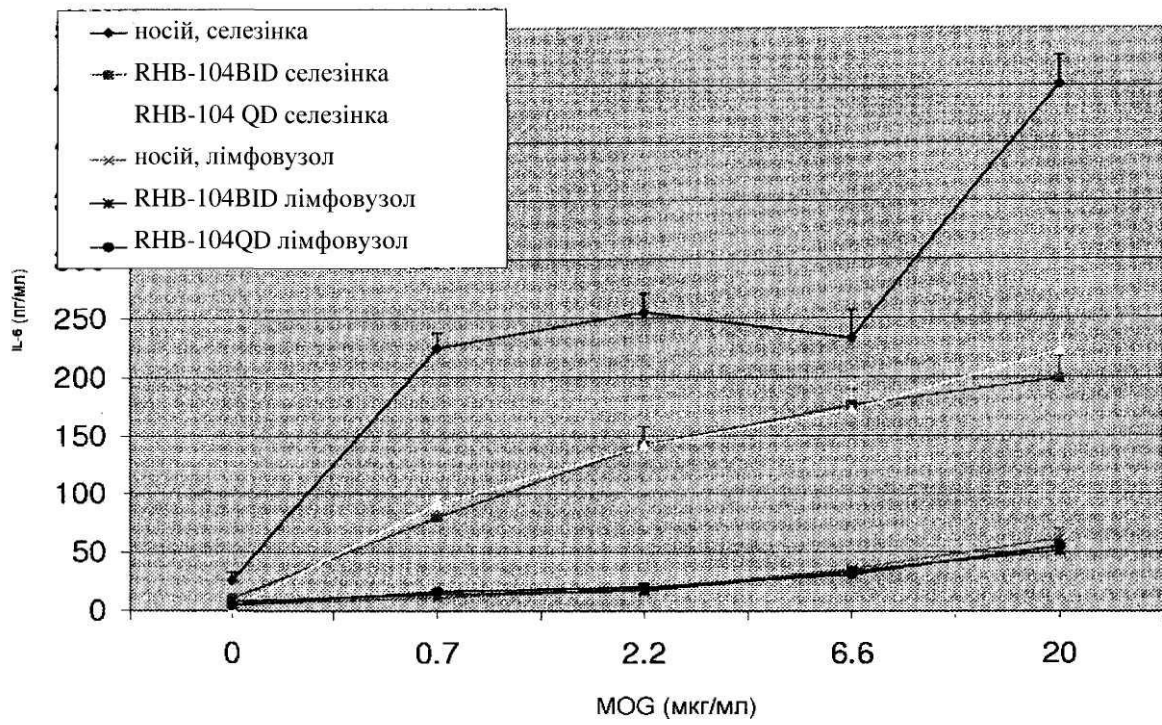
Фіг. 1



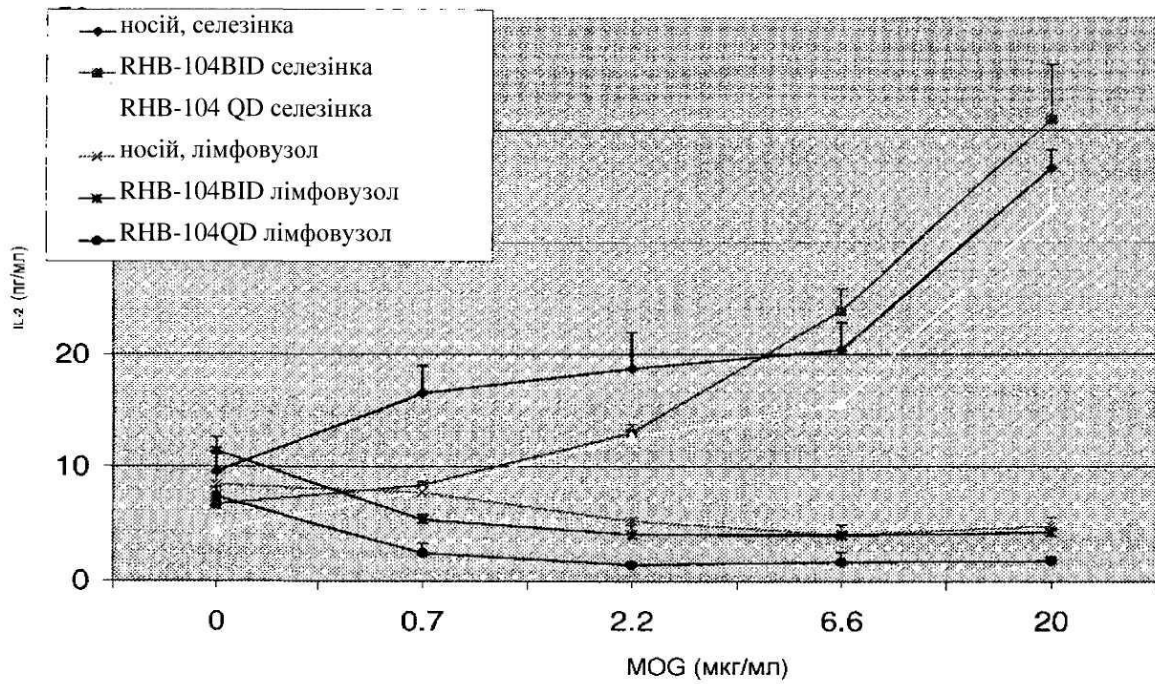
Фіг. 2



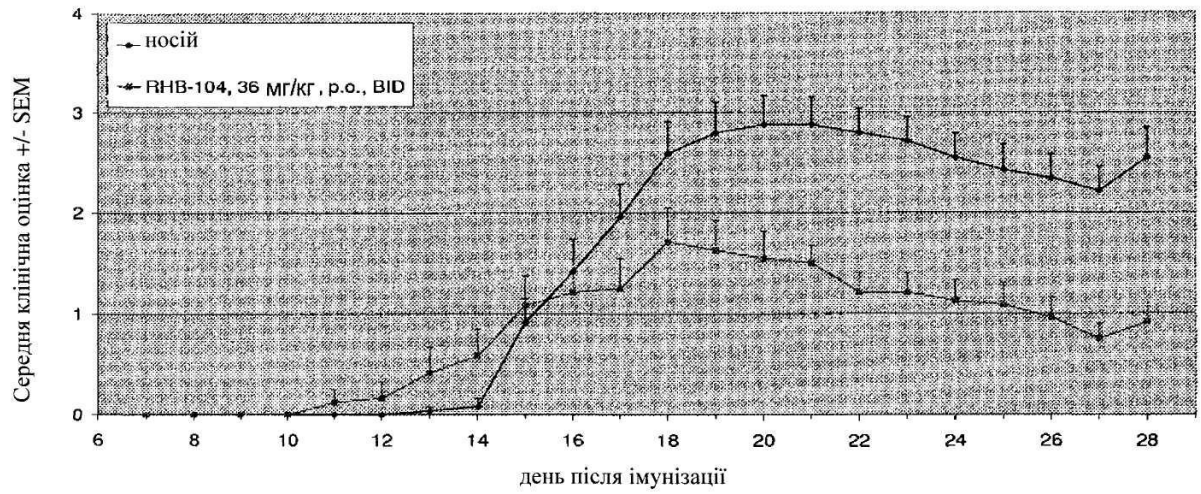
Фіг. 3



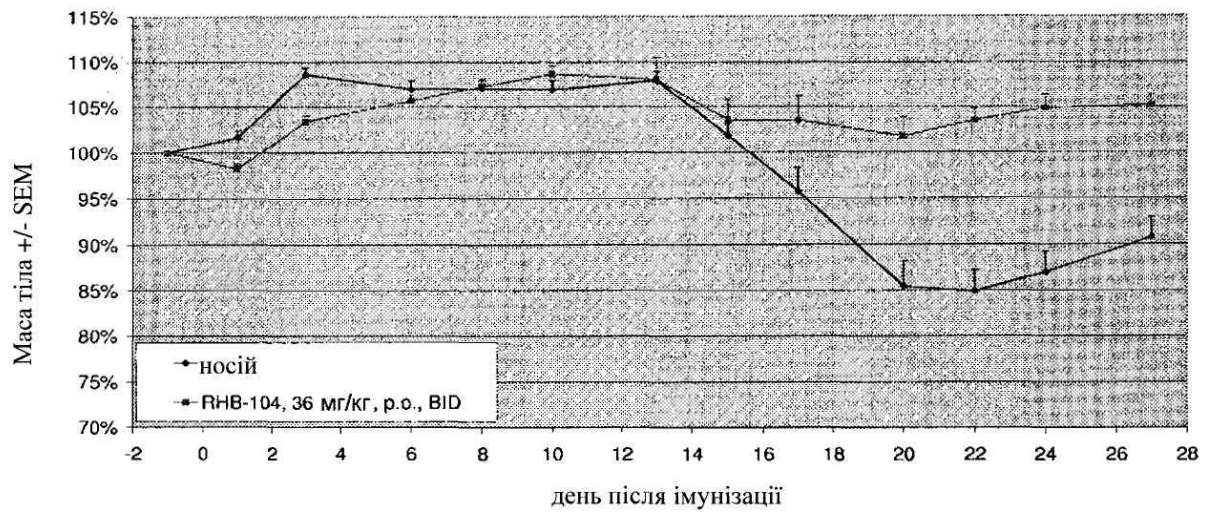
Фіг. 4



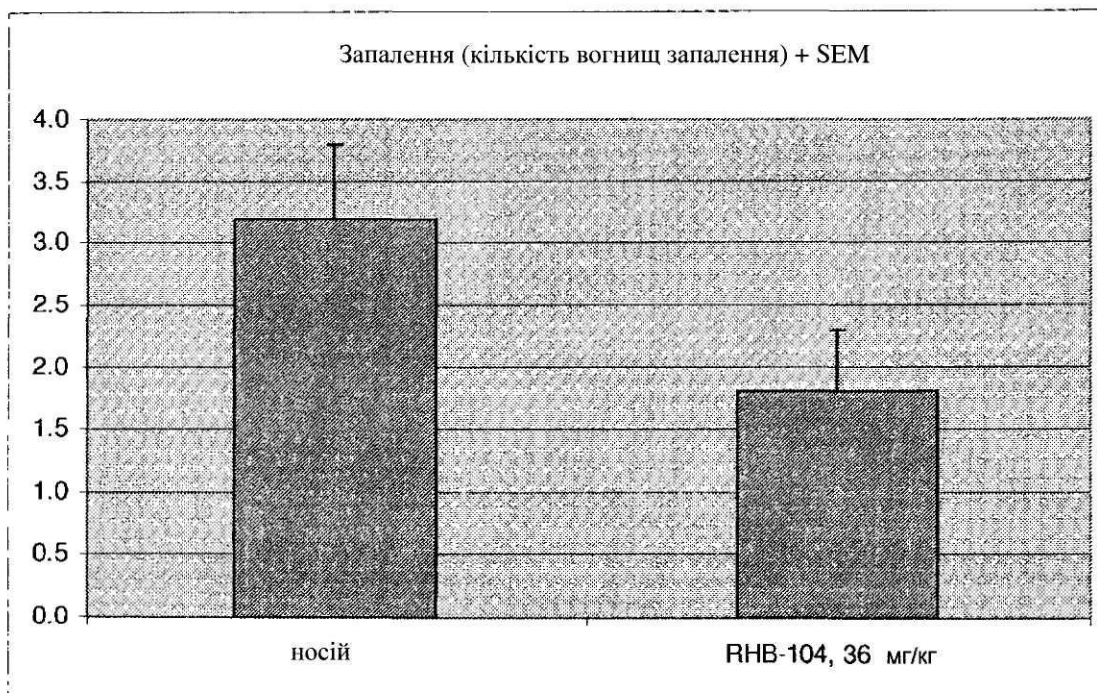
Фіг. 5



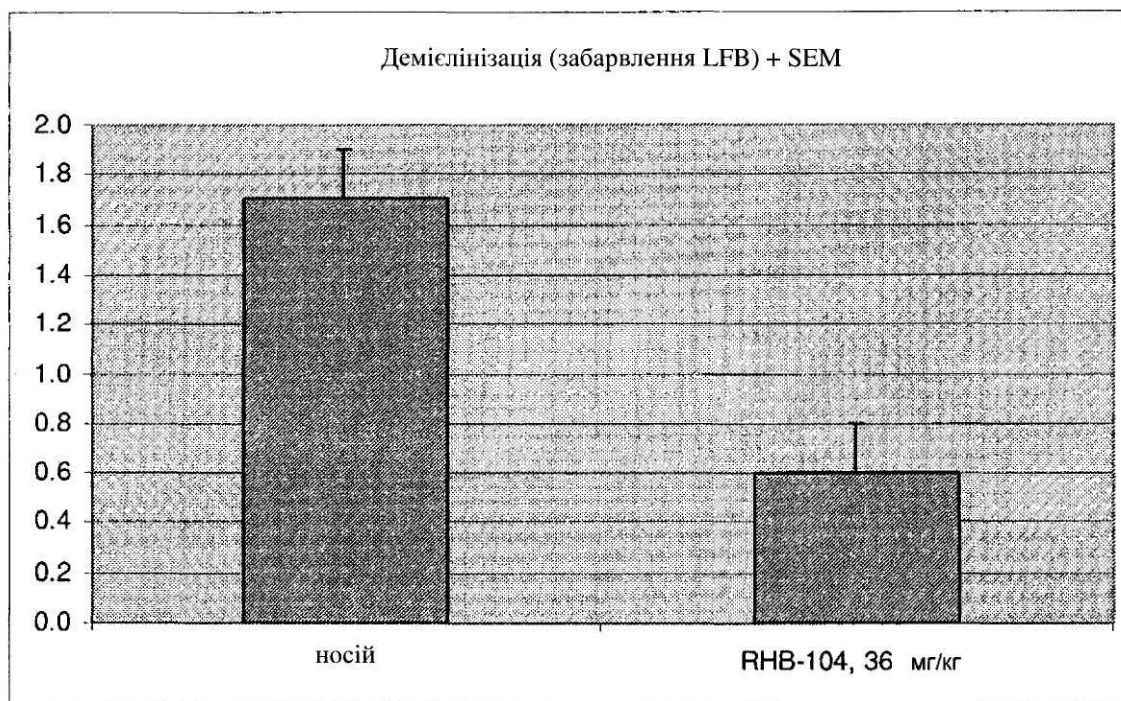
Фіг. 6



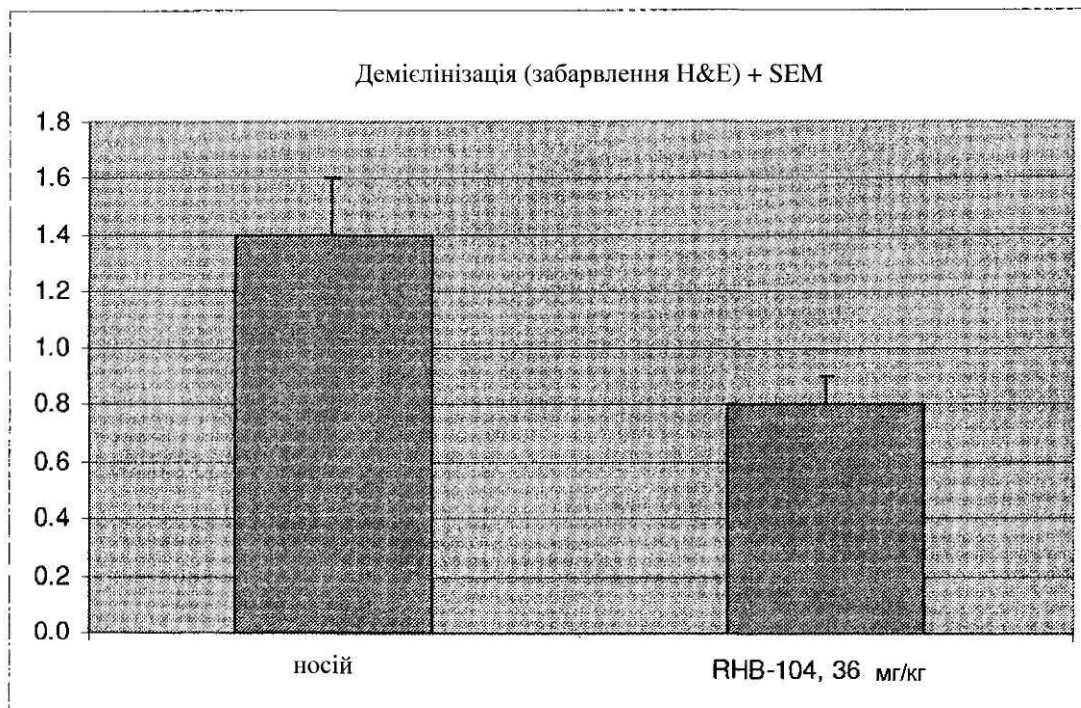
Фіг. 7



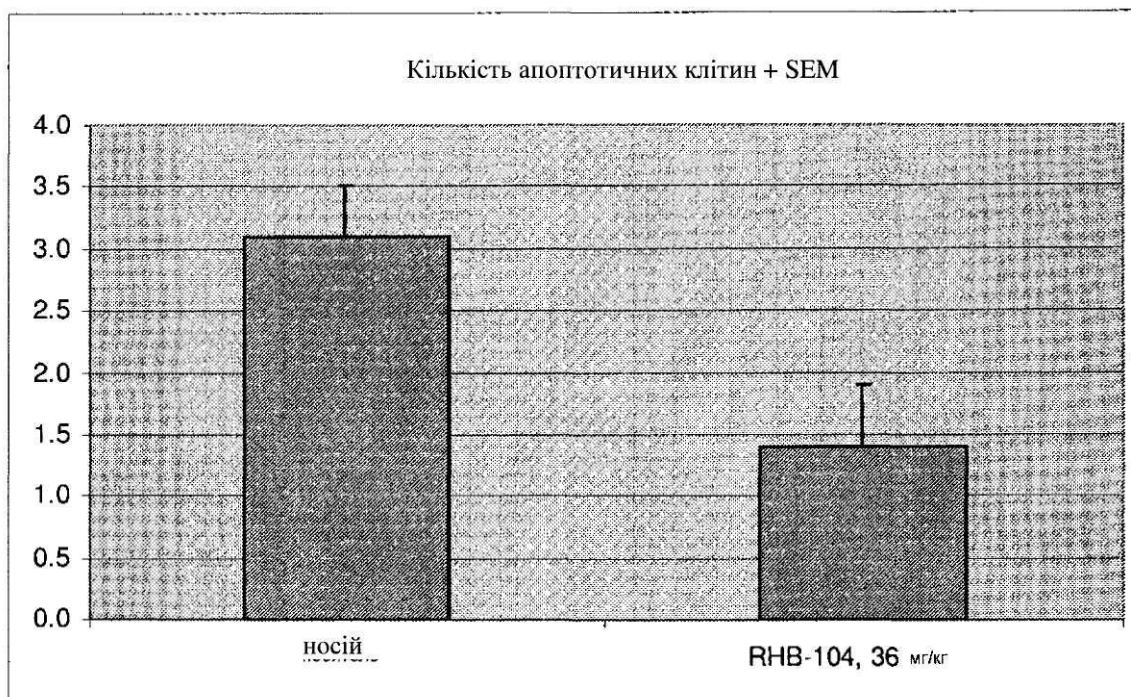
Фіг. 8



Фіг. 9



Фіг. 10



Фіг. 11

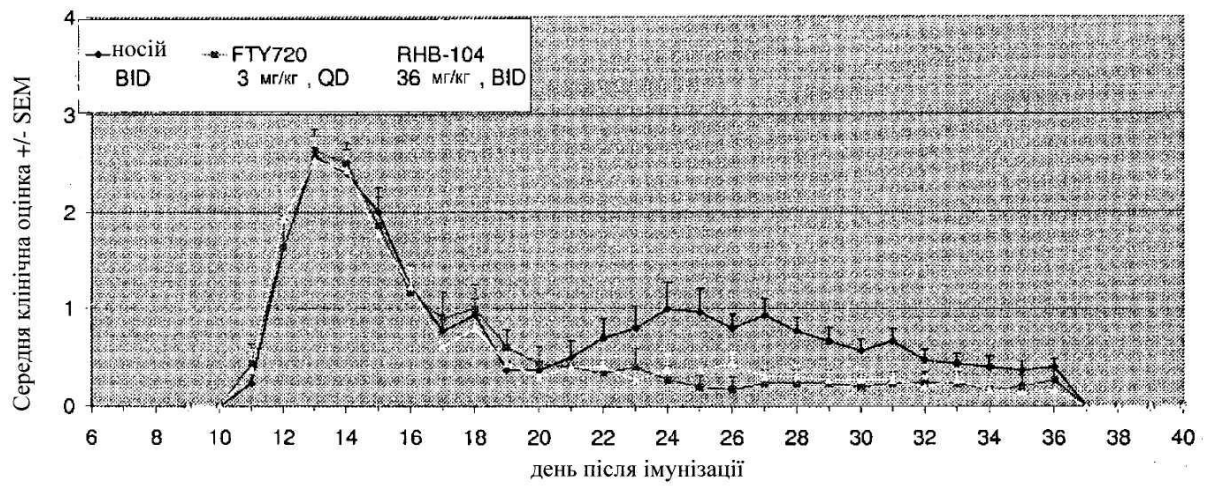


Fig. 12

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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