



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **114811**

(13) **C2**

(51) МПК

A61K 31/138 (2006.01)

A61K 31/137 (2006.01)

A61K 31/185 (2006.01)

A61K 31/195 (2006.01)

A61K 31/42 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 10678	(72) Винахідник(и):	Коен Даніель (FR), Набірочкін Сергій (FR), Чумаков Ілія (FR), Хадж Родольф (FR)
(22) Дата подання заявки:	28.02.2013	(73) Власник(и):	ФАРНЕКСТ, 11 rue des Peupliers, F-92130 Issy les Moulineaux, France (FR)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.08.2017	(74) Представник:	Слободянюк Тарас Олександрович, реєстр. №217
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	PCT/EP2012/053565, PCT/EP2012/053570	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2009/133141 A2, 05.11.2009 WO 2009/133142 A1, 05.11.2009 WO 2009/133128 A1, 05.11.2009 WO 2012/117073 A2, 07.09.2012 & UA a201311479, дата пріоритету 29.03.2011
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	01.03.2012, 01.03.2012		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву:	EP, EP		
(41) Публікація відомостей про заяву:	25.12.2014, Бюл.№ 24		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.08.2017, Бюл.№ 15		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2013/054024, 28.02.2013		

(54) ЗАСТОСУВАННЯ АКАМПРОСАТУ ТА БАКЛОФЕНУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ АМІОТРОФІЧНОГО БІЧНОГО СКЛЕРОЗУ

(57) Реферат:

Винахід стосується застосування акампросату та баклофену або їх солі для виробництва медикаменту для лікування ALS або захворювання рухових нейронів, вибраного з первинного латерального склерозу (PLS), прогресуючої м'язової атрофії (PMA), псевдобульбарного синдрому і прогресуючого бульбарного синдрому (PBP), а також лобово-скроневої деменції (FTD).

UA 114811 C2



Фіг. 1

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід має відношення до композицій і способів лікування аміотрофічного бічного склерозу й споріднених хвороб. Конкретніше, даний винахід має відношення до нових видів комбінованої терапії для лікування аміотрофічного бічного склерозу й споріднених хвороб.

5 Попередній рівень техніки

Аміотрофічний бічний склероз (ALS), також відомий як хвороба Лу Геріґа, є хворобою рухових нейронів, яка зустрічається у дорослих. Уперше він був описаний в 1869 році французьким невропатологом Жаном-Мартеном Шарко. Ця хвороба характеризується дегенерацією й відмиранням моторних нейронів, що призводить до загальної слабості й атрофії м'язів. Хвороба неминуче прогресує, причому 50 % пацієнтів помирає протягом 3 років від початку хвороби. ALS вважається рідкісним захворюванням з поширеністю 4 – 6 на 100000 щороку й із частотою виникнення захворювання 1 – 2 на 100000 щороку.

Більшість випадків захворювання (90 %) є спорадичними випадками ALS (SALS), а решта 10 % випадків захворювання є спадковими й розглядаються як сімейний ALS (FALS) з менделевським типом успадкуванням. Із клінічної точки зору випадки сімейного (FALS) і спорадичного (SALS) захворювання не відрізняються один від одного, за винятком віку початку SALS, який на 10 років більший, ніж вік початку FALS (56 років проти 46 років) [1]. Причини більшості випадків ALS невідомі, а клінічний перебіг украй мінливий, що вказує на те, що в основі механізму хвороби лежить багато факторів. Є незначна кількість варіантів лікування.

20 Відрізняючою ознакою цієї хвороби є вибіркове відмирання моторних нейронів, розташованих у стовбурі головного мозку, рухової області кори головного мозку й спинному мозку, що призводить до паралічу м'язів, здатних довільно скорочуватися. Параліч починається в окремих вогнищах, а спосіб його поширення вказує на те, що дегенерація поширюється серед пулів контактуючих моторних нейронів. Смерть у більшості випадків настає в результаті погіршення контролю над діафрагмою й втрати здатності дихати.

ALS характеризується прогресуючими проявами дисфункції як нижніх, так і верхніх рухових нейронів. Нижні моторні нейрони з'єднують стовбур головного мозку й спинний мозок з м'язовими волокнами. Їх дисфункція призводить до атрофії м'язів, спазмів і фаскуляціям (невеликим, осередковим, мимовільним скороченням м'язових волокон). Верхні моторні нейрони беруть початок у руховій області кори головного мозку або в стовбурі головного мозку й передають рухову інформацію вниз до моторних нейронів, які несуть безпосередню відповідальність за стимулювання цільового м'яза. Їх дисфункція приводить до спастичності (безперервного м'язового скорочення, яке перешкоджає ходьбі, руху й мові) і патологічним рефлексам [2]. Інші споріднені хвороби мотонейронів звичайно відрізняються типом уражених нервових клітин, тобто верхніми або нижніми моторними нейронами: ці хвороби відомі як первинний латеральний склероз (PLS) прогресуюча м'язова атрофія (PMA), псевдобульбарний синдром і прогресуючий бульбарний синдром (PBP).

Діагностування ALS ґрунтується на клінічних ознаках, установлених невропатологом, виходячи з історії хвороби, топографічного поширення втрати нейронів і виявлення деяких характерних цитологічних змін. Однак не існує однозначного доступного діагностичного тесту для ALS. Клінічні ознаки класифікуються відповідно до порушених неврологічних областей, що представляють собою бульбарну, цервікальну й лямбальну області.

Як уже було згадано, дегенерація при ALS переважно торкається рухової системи. Однак, нещодавно повідомлялося про когнітивні й поведінкові симптоми, а також симптоми порушення чутливості [3, 4], крім того існує доказ клінічного й патологічного часткового збігу між лобово-скроневою деменцією (FTD) і ALS [17].

Деякі слабкі докази говорять про те, що початок ALS може ініціюватися передбачуваними факторами навколишнього середовища [5-6].

Повідомлялося, що деякі мутуючі гени або ділянки генома викликають або зумовлюють схильність до ALS, а також до ALS з лобово-скроневою деменцією (FTD) [7-9]. Наприклад, близько 20-25 % усіх випадків FALS і близько 1 % випадків SALS виникають внаслідок мутацій супероксиддисмутази SOD1 [10]. В одній і тій же родині спостерігаються різноманітні клінічні прояви за однакової мутації SOD1, яка необов'язково викликає гомогенний фенотип. Не існує явної кореляції між активністю ферменту, клінічним перебігом і фенотипом хвороби. Однак строк хвороби є подібним незалежно від того, чи є мутація. Історично склалося, що відкриття мутацій SOD1 привело до створення перших тваринних моделей ALS. Була створена хвороба рухових нейронів наближено схожа на ALS людини [11-12]. У числі генів, задіяних у розвиток ALS або споріднених хвороб рухових нейронів, можуть бути згадані алсин, який міняє фактор Rab5A [13], сенатаксин, який можливо бере участь у процесингу PHK, VAPB білок, який регулює транспорт везикул, основний аксональний ретроградний моторний протеїн динактин,

мітохондріальні гени для цитохром С оксидази й ізолейцин тРНК синтетази [14-15], ангіогенні модулятори VEGF і ангіогенін [16].

ALS є комплексною хворобою, при цьому причини й точні механізми, які задіяні у патогенезі цієї хвороби, ще не встановлені. Це стимулює розробку ефективного фармакологічного лікування. Клінічні випробування показали, що рилузол незначно збільшує виживання (а не функціональну здатність) при ALS [18]. Проте, у цей час рилузол є єдиним схваленим лікарським засобом і єдиним видом лікування при ALS. Що стосується тяжкості хвороби, він врешті вводиться всім пацієнтам, які страждають на ALS, як сполука, яка змінює перебіг хвороби.

WO 2009/133128, WO 2009/133141, WO 2009/133142, WO 2011/054759, WO 2009/068668 і WO 2009/153291 розкривають можливі види лікування деяких нейродегенеративних захворювань, серед яких ALS.

Були зроблені перші спроби створення рекомендацій з нефармакологічного лікування. Однак стандарти як і раніше ґрунтуються на думці експертів і відрізняються у різних країнах.

Відповідно, усе ще існує стійка необхідність у даній галузі в нових і ефективних видах терапії для лікування аміотрофічного бічного склерозу.

Сутність винаходу

Даний винахід пропонує нові композиції й способи лікування ALS і споріднених хвороб. Винахід, зокрема, обумовлюється встановленням комбінацій лікарських засобів, які забезпечують поліпшений терапевтичний ефект і клінічну користь суб'єктам з ALS.

Конкретніше, ціль винаходу має стосунок до композиції, призначеної для використання при лікуванні ALS або споріднених хвороб, яка містить, щонайменше, два лікарські засоби, обрані з акампросату, баклофену, цинакальцету, мексилетину, сульфізоксазолу й торасеміду, або солей, проліків, похідних будь-якої хімічної чистоти або їх композиції з уповільненим вивільненням.

Додатковою метою винаходу є спосіб лікування ALS або споріднених хвороб у суб'єкта, який цього потребує, який передбачає введення суб'єктові, щонайменше, двох лікарських засобів, обраних з поміж акампросату, баклофену, цинакальцету, мексилетину, сульфізоксазолу й торасеміду, або солей, проліків, похідних будь-якої хімічної чистоти або їх композиції з уповільненим вивільненням.

Кращі приклади комбінацій лікарських засобів, призначених для використання у винаході, включають, наприклад, баклофен і акампросат; торасемід і баклофен; баклофен і цинакальцет; торасемід і сульфізоксазол; мексилетин і цинакальцет; або баклофен і акампросат і торасемід.

В окремому варіанті здійснення винаходу композиція додатково містить рилузол, або сіль, проліки, похідне будь-якої хімічної чистоти або його композицію з уповільненим вивільненням.

Композиції запропоновані винаходом можуть додатково містити один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв або ексципієнтів, причому вони можуть вводитися суб'єктові багаторазово. Кращі композиції вводяться перорально. Більше того, лікарські засоби можуть створюватися або вводитися разом, окремо або послідовно.

Винахід придатний для лікування ALS у якого-небудь ссавця, зокрема в людини, на будь-якій стадії хвороби. Винахід може використовуватися для гальмування розвитку хвороби, для зменшення, відтермінування або запобігання паралічу, дегенерації рухових нейронів і/або збільшення виживання.

Підписи до фігур

Фігура 1: Дія комбінованого лікування баклофеном і акампросатом від токсичності глутамату на нейрони кори головного мозку. Застосування комбінації баклофену (400 нМ) і акампросату (1,6 нМ) значною мірою запобігає інтоксикації глутаматом, тоді як у тих же концентраціях баклофен і акампросат окремо не виявляють значного впливу на інтоксикацію. *: $p < 0,001$, значима відмінність від інтоксикації глутаматом; (ANOVA + апостеріорний тест Дуннетта).

Фігура 2: Дія комбінованого лікування баклофеном і акампросатом від токсичності глутамату (GLU) на моделі спільно культивованих нервово-м'язових клітин на кількість (А), площа (В) і довжину нейритів (С) моторних одиниць. Незалежно від розглянутої кінцевої точки, комбінація баклофену (BCL, 80 нМ) і акампросату (ACP, 0,32 нМ) значною мірою запобігає інтоксикації глутаматом, тоді як у тих же концентраціях баклофен і акампросат окремо не виявляють значного впливу на інтоксикацію. *: $p < 0,05$, значима відмінність від інтоксикації глутаматом; (ANOVA + апостеріорний тест Дуннетта).

Фігура 3: Ефект комбінованого лікування цинакальцетом і мексилетином від токсичності глутамату на нейронах кори головного мозку. Комбінація цинакальцету (64 рМ) і мексилетину (25,6 рМ) значною мірою запобігає інтоксикації глутаматом, тоді як у тих же концентраціях цинакальцет і мексилетин окремо не виявляють значного впливу на інтоксикацію. *: $p < 0,001$,

значима відмінність від інтоксикації глутаматом; (ANOVA + апостеріорний тест Дуннетта).

Фігура 4: Ефект комбінованої терапії сульфізоксазолом і торасемідом від токсичності глутамату на нейронах кори головного мозку. Комбінація сульфізоксазолу (6,8 нМ) і торасеміду (400 нМ) значною мірою запобігає інтоксикації глутаматом, тоді як у тих же концентраціях сульфізоксазол і торасемід окремо не виявляють значного впливу на інтоксикацію. *: $p < 0,001$, значима відмінність від інтоксикації глутаматом; (ANOVA + апостеріорний тест Дуннетта).

Фігура 5: Комбінація баклофену (BCL) і акампросату (ACP) діє як "підсилювач" захисного ефекту рилузолу (RIL) від токсичності глутамату на моделі спільно культивованих нервово-м'язових клітин на площу (A) і довжину нейритів (B) моторних одиниць. Досить сильний посилюючий ефект спостерігається при використанні мінімальних концентрацій ACP (0,14 нМ) BCL (36 нМ), у порівнянні з ефектом, отриманим при ACP (0,32 нМ) BCL (80 нМ).

Фігура 6: Баклофен (BCL) і акампросат (ACP) діють синергічно з рилузолом при захисті нервово-м'язових сполук від токсичності глутамату на моделі спільно культивованих нервово-м'язових клітин. Значне посилення захисту спостерігається при вимірюванні кількості, площі, а також довжини нейритів моторних одиниць. A) поліпшення кінцевих критеріїв оцінки від 2 до 5 % спостерігається при комбінації ACP (0,14 нМ) і BCL (36 нМ); від 12 до 16 % при використанні одного рилузолу (0,04 мкМ); тоді як комбінація 3 лікарських засобів дає в результаті поліпшення від 39 до 43 %. B) поліпшення кінцевих критеріїв оцінки від 2 до 5 % спостерігається при комбінації ACP (0,14 нМ) і BCL (36 нМ); від 70 до 88 % при використанні рилузолу 5 мкМ; тоді як комбінація 3 лікарських засобів дає в результаті поліпшення від 131 до 165 %. (*: $p < 0,001$, значима відмінність від інтоксикації глутаматом; $\diamond p < 0,001$, значима відмінність (ANOVA + апостеріорний тест Дуннетта)).

Докладний опис винаходу

Даний винахід пропонує нові терапевтичні підходи для лікування ALS або споріднених хвороб. Конкретніше, даний винахід розкриває нові види комбінованої терапії, що забезпечують можливість ефективної корекції подібних хвороб, які можуть застосовуватися для будь-якого ссавця.

У контексті винаходу термін "лікування" хвороби включає лікування, запобігання, профілактику, гамування або зменшення болі, спричиненої захворюванням. Термін лікування включає, зокрема, контроль над розвитком хвороби й пов'язаних з нею симптомів. У відношенні ALS термін лікування також означає затримку або більш пізній початок паралічу, зменшення або запобігання дегенерації рухових нейронів, зменшення болі й/або збільшення виживання.

Термін "споріднені з ALS хвороби" відноситься до хвороб рухових нейронів, таких як первинний латеральний склероз (PLS), прогресуюча м'язова атрофія (PMA), псевдобульбарний синдром і прогресуючий бульбарний синдром (PBP), а також лобово-скронева деменція (FTD).

Термін "комбінація або комбіноване лікування/терапія" означає лікування, при якому, щоб викликати біологічний ефект, суб'єктові вводять разом, щонайменше, два або більше лікарські засоби. При комбінованій терапії згідно із цим винаходом, щонайменше, два лікарські засоби можуть вводитися разом або окремо в той самий час або послідовно. Крім того, щонайменше, два лікарські засоби можуть вводитися з використанням різних способів і протоколів. Більше того, у той час як лікарські засоби можуть бути разом включені в одну композицію, вони також можуть бути окремими лікарськими засобами.

Як обговорювалося вище, винахід має відношення до композицій лікарських препаратів і способів лікування ALS або споріднених хвороб у суб'єкта, який цього потребує.

Конкретніше, винахід має відношення до композиції, призначеної для лікування аміотрофічного бічного склерозу (ALS) або споріднених хвороб, яка містить, щонайменше, два лікарські засоби, обрані із групи, яка складається з акампросату, баклофену, цинакальцету, мексилетину, сульфізоксазолу й торасеміду, або солей або проліків або похідних будь-якої чистоти або їх композицій з уповільненим вивільненням.

Винахідники несподівано виявили, що ці сполуки, у комбінації(ях), демонструють захисну активність від токсичності глутамату, яка є однією із причин смерті нейронів, на *in vitro* моделі ALS.

Конкретніше, винахід показує, що лікарські засоби запропоновані винаходом продемонстрували несподівану захисну дію відносно рухових нейронів від токсичності глутамату, яка є однією з етіологічних причин нервової дегенерації при ALS. Більше того, винахідники виявили, що ці композиції, у низьких дозах, ефективно захищають моторні одиниці, діючи синергічно. Це є істотною перевагою, зокрема, дозволяючи уникати можливих побічних дій. Більше того, як показано в експериментальній частині, таке комбіноване лікування може затримувати початок паралічу *in vivo* на тваринних моделях ALS і збільшувати тривалість життя. Отже, таке комбіноване лікування є значним поліпшенням лікування суб'єктів з ALS.

Відповідно, винахід має відношення до композиції, призначеної для лікування аміотрофічного бічного склерозу (ALS) або спорідненого захворювання, яка включає, щонайменше, два лікарські засоби, обраних з поміж акампросату, баклофену, цинакальцету, мексилетину, сульфізоксазолу й торасеміду, або солі(ей) або проліків або похідного(их) будь-якої чистоти або їх композицій з уповільненим вивільненням.

Винахід також має відношення до способу лікування аміотрофічного бічного склерозу (ALS) або спорідненого захворювання в суб'єкта, який цього потребує, який передбачає введення суб'єктові, щонайменше, двох лікарських засобів, обраних із групи, яка складається з акампросату, баклофену, цинакальцету, мексилетину, сульфізоксазолу й торасеміду, або солі(ей) або проліків або похідного(их) будь-якої чистоти або їх композицій з уповільненим вивільненням.

Винахід також має відношення до сполуки, обраної з поміж акампросату, баклофену, цинакальцету, мексилетину, сульфізоксазолу й торасеміду, або солі(ей) або проліків або похідного(их) будь-якої чистоти або їх композицій з уповільненим вивільненням, у комбінації, щонайменше, з однією другою сполукою, обраною з поміж акампросату, баклофену, цинакальцету, мексилетину, сульфізоксазолу й торасеміду, або солі(ей) або проліків або похідного(их) будь-якої чистоти або їх композицій з уповільненим вивільненням, для застосування при лікуванні аміотрофічного бічного склерозу (ALS) або спорідненого захворювання шляхом комбінованого, окремого або послідовного введення суб'єктові, який цього потребує.

Кращі комбінації для застосування в даному винаході включають, щонайменше, одну з наступних лікарських комбінацій, призначених для одночасного, послідовного або роздільного введення:

- баклофен і цинакальцет,
- цинакальцет і акампросат,
- баклофен і акампросат,
- баклофен і акампросат і торасемід,
- мексилетин і цинакальцет,
- торасемід і баклофен, або
- торасемід і сульфізоксазол,

або сіль(і) або проліки або похідне(і) будь-якої чистоти або їх композиції з уповільненим вивільненням для застосування при лікуванні ALS або споріднених хвороб. Композиції, які містять такі комбінації, також є конкретною метою винаходу.

Використаний в описі термін "проліки" має відношення до будь-яких функціональних похідних (або попередників) сполук даного винаходу, які, при введенні в біологічну систему, утворюють зазначену сполуку в результаті, наприклад, спонтанної хімічної реакції(ій), каталізованої ферментом хімічної реакції(ій) і/або метаболічної хімічної реакції(ій). У більшості випадків проліки є неактивними або менш активними, ніж лікарський засіб, отриманий у результаті, і можуть використовуватися, наприклад, для поліпшення фізико-хімічних властивостей лікарського засобу, для націлювання лікарського засобу на конкретну тканину, для поліпшення фармакокінетичних і фармакодинамічних властивостей лікарського засобу й/або для зменшення небажаних побічних ефектів. Деякі зі звичайних функціональних груп, які використовуються при створенні проліків, включають, але не обмежуються цим, карбоксильну, гідроксильну, амінну, фосфатну/фосфонатну й карбонільну групи. Як правило, проліки, одержані шляхом модифікації цих груп, включають, але не обмежуються названим, складні ефіри, карбонати, карбамати, аміді й фосфати. Спеціальні технічні посібники з вибору придатних проліків є загальнодоступними (19-23). Крім того, виготовлення проліків може здійснюватися звичайними методами, відомими фахівцям у даній галузі техніки. Методи, які використовуються для синтезу інших проліків, описані в численних оглядах з даного предмету (20; 24-30). Наприклад, арбаклофен плакарбіл наведений у списку Chemid і базі даних Advance database (інтернет-сайт: chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/), арбаклофен плакарбіл є добре відомими проліками баклофену (31-32). Конкретні приклади проліків баклофену наведені в Hanafi et al., 2011 (33), зокрема складні ефіри баклофену й карбамати складних ефірів баклофену, які становлять особливий інтерес для націлювання на ЦНС. Отже, такі проліки є придатними, зокрема, для композицій цього винаходу. Арбаклофен плакарбіл, як уже було сказано вище, також є добре відомими проліками й у такий спосіб може використовуватися замість баклофену в композиціях запропонованих винаходом. Інші проліки баклофену можна знайти в наступних патентних заявках: WO2010102071, US2009197958, WO2009096985, WO2009061934, WO2008086492, US2009216037, WO2005066122, US2011021571, WO2003077902, WO2010120370.

Придатні проліки акампросату, такі як складні ефіри пантоєвої кислоти, неопентил сульфонілові складні ефіри, проліки неопентил сульфоніл складних ефірів або проліки акампросату прихованого карбоксилат неопентил сульфонілового складного ефіру перераховані, зокрема, в WO2009033069, WO2009033061, WO2009033054 WO2009052191, 5 WO2009033079, US 2009/0099253, US 2009/0069419, US 2009/0082464, US 2009/0082440 і US 2009/0076147.

Термін "похідне" сполуки включає будь-яку молекулу, функціонально й/або структурно пов'язану із зазначеною сполукою, таку як кислота, амід, складний ефір, простий ефір, ацетильований варіант, гідроксильований варіант або алкільований (C1-C6) варіант такої 10 сполуки. Термін "похідне" також включає структурно споріднену сполуку, яка втратила один або більше перерахованих вище замісників. Наприклад, гомотурин є деацетильованим похідним акампросату. Кращими похідними сполук є молекули, які мають істотний ступінь подібності до зазначеної сполуки, яка визначається за допомогою відомих методів. Подібні сполуки разом з їхнім індексом подібності з вихідною молекулою можуть бути знайдені в багатьох базах даних, 15 таких як PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>) або DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>). У кращому варіанті здійснення похідні повинні мати індекс подібності Танімото більше, ніж 0,4, бажано більше, ніж 0,5, краще, більше, ніж 0,6, навіть ще краще, більше, ніж 0,7 з вихідним лікарським засобом. Індекс подібності Танімото широко використовується для визначення ступеня структурної подібності між двома молекулами. Індекс 20 подібності Танімото може бути обчислений за допомогою програмного забезпечення, такого як Small Molecule Subgraph Detector (34-35), доступного онлайн (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/SMSD/>). Кращі похідні повинні бути й структурно й функціонально пов'язаними з вихідною сполукою, тобто, вони також повинні зберігати, щонайменше, частину активності вихідного лікарського засобу, бажано вони повинні демонструвати захисну активність від токсичності глутамату відносно моторних одиниць (на прикладі експериментальної частини). 25

Термін похідні також включає метаболіти лікарського засобу, наприклад, молекулу, яка є результатом (біохімічної) модифікації(й) або обробки зазначеного лікарського засобу після введення в організм, звичайно за допомогою спеціалізованих систем ферментів, і які проявляють або зберігають біологічну активність лікарського засобу. Метаболіти розкриваються 30 як такі, що відповідають за більшу частину терапевтичної дії вихідного лікарського засобу. В окремому варіанті здійснення використаний в описі термін "метаболіт" позначає модифікований або оброблений лікарський засіб, який зберігає, щонайменше, частину активності вихідного лікарського засобу, більш бажано метаболіти повинні мати захисну активність від токсичності глутамату відносно моторних одиниць (на прикладі експериментальної частини). Приклади 35 метаболітів включають гідроксильовані форми торасеміду, що є результатом метаболізму лікарського засобу в печінці (Drug bank database (36)).

Термін "сіль" відноситься до фармацевтично прийнятної й відносно нетоксичної, неорганічної або органічної солі приєднання кислоти сполуки даного винаходу. Утворення фармацевтичної солі полягає в з'єднанні кислоти, основної або цвітер-іонної молекули 40 лікарського засобу із протиіоном з метою утворення сольової версії лікарського засобу. Велика кількість хімічних сполук може використовуватися в реакції нейтралізації. Фармацевтично прийнятні солі винаходу, таким чином, включають солі, отримані шляхом взаємодії головної сполуки, яка виконує функцію основи, з неорганічною або органічною кислотою з утворенням солі, наприклад, солі оцтової кислоти, азотної кислоти, винної кислоти, хлористоводневої 45 кислоти, сірчаної кислоти, фосфорної кислоти, метансульфонової кислоти, камфорсульфонової кислоти, щавлевої кислоти, малеїнової кислоти, бурштинової кислоти або лимонної кислоти. Фармацевтично прийнятні солі запропоновані винаходом також включають солі, у яких головна сполука виконує функцію кислоти й реагує з придатною основою з утворенням, наприклад, солей натрію, калію, кальцію, магнію, амонію або холінових солей. Хоча більша частина солей 50 даного активного компонента є біоеквівалентами, деякі можуть мати, серед іншого, підвищену розчинність або біодоступність. Вибір солей у цей час є звичайною стандартною процедурою в процесі створення лікарського засобу, як зазначено в інструкції H. Stahl and C.G Wermuth (37).

У кращому варіанті здійснення позначення сполуки передбачає позначення як власне сполуки, так і будь-якої її фармацевтично прийнятної солі, гідрату, ізомеру або рацемата.

Таблиця I нижче наводить номер CAS сполук для використання у винаході, а також солі(ей), похідних, метаболітів і/або проліків даних сполук.

Таблиця 1

Лікарський засіб	Номера CAS	Клас або індекс подібності Танімото
акампросат і споріднені сполуки		
акампросат	77337-76-9; 77337-73-6	NA
гомотаурин	3687-18-1	0.73
етил-диметил-амоніо-пропан-сульфонат	/	0.77
таурин	107-35-7	0.5
баклофен і споріднені сполуки		
баклофен	1134-47-0; 66514-99-6; 69308-37-8; 70206-22-3; 63701-56-4; 63701-55-3	NA
3-(p-хлорфеніл)-4-гідроксималяна кислота	/	метаболіт
арбаклофен плакарбіл	847353-30-4	проліки
мексилетин і споріднені сполуки		
мексилетин	31828-71-4; 5370-01-4	
6-гідроксиметилмексилетин	53566-98-6	метаболіт
4-гідроксимексилетин	53566-99-7	метаболіт
3-гідроксимексилетин (МНМ)	129417-37-4	метаболіт
N-гідроксимексилетин глюкуронід	151636-18-9	метаболіт
сульфізоксазол і споріднені сполуки		
сульфізоксазол	127-69-5; 4299-60-9	
N(4)-ацетилсульфізоксазол	4206-74-0	метаболіт
сульфізоксазол ацетил	80-74-0	проліки
сульфаметоксазол	723-46-6	0.52
цинакальцет і споріднені сполуки		
цинакальцет	226256-56-0; 364782-34-3	
гідрокорична кислота	501-52-0	метаболіт
торасемід і споріднені сполуки		
торасемід	56211-40-6; 72810-59-4	
гідрокситорасемід	99300-68-2; 99300-67-1	метаболіти
карбокситорасемід		метаболіт
толбутамід	64-77-7	0.55

Більш бажано лікарські композиції запропоновані винаходом включають 2, 3, 4 або 5 різних лікарських засобів, навіть більш бажано, 2, 3 або 4 різних лікарських засобів для заснованого на комбінуванні лікування ALS або спорідненого захворювання в суб'єкта, який цього потребує.

В окремому варіанті здійснення винахід має відношення як власне до композиції, так і до композиції, яка містить баклофен і цинакальцет, або акампросат і цинакальцет, або сіль(і) або проліки або похідне(і) будь-якої чистоти або їх композиції з уповільненим вивільненням.

У більш конкретному варіанті здійснення винахід має відношення до композиції, яка містить акампросат і цинакальцет або сіль(і) або проліки або похідне(і) будь-якої чистоти або їх композиції з уповільненим вивільненням, призначених для застосування при лікуванні ALS або спорідненого захворювання, у якій щоденне дозування акампросату дорівнює або менше 10 мг.

Крім того, в іншому конкретному варіанті здійснення композиції й способи запропоновані винаходом додатково використовують рилузол, або сіль, проліки, похідне будь-якої чистоти або їх композиції з уповільненим вивільненням. Представлені результати дійсно несподівано показують, що при використанні в комбінації з рилузолом (CAS n° 1744-22-5) суттєво збільшується клінічна користь лікування пацієнтів композиціями запропонованими винаходом.

Відповідно, окремою метою цього винаходу є композиція, яка містить i) щонайменше, один лікарський засіб, обраний з поміж акампросату, баклофену, цинакальцету, мексилетину, сульфідоксазолу й торасеміду, та ii) рилузол, призначений для одночасного, окремого або послідовного застосування при лікуванні ALS або спорідненого захворювання.

Іншою конкретною метою цього винаходу є описана вище композиція, яка містить i) щонайменше, два лікарські засоби, обраних з поміж акампросату, баклофену, цинакальцету,

мексилетину, сульфізоксазолу й торасеміду, і ii) рилузол, призначений для одночасного, окремого або послідовного застосування при лікуванні ALS або спорідненого захворювання.

Кращою метою цього винаходу є композиція, яка містить, щонайменше, одну з наступних лікарських комбінацій:

- 5 - рилузол, баклофен і цинакальцет,
 - рилузол, цинакальцет і акампросат,
 - рилузол, баклофен і акампросат,
 - рилузол, баклофен і акампросат і торасемід,
 - рилузол, мексилетин і цинакальцет,
- 10 - рилузол, торасемід і баклофен, або
 - рилузол, торасемід і сульфізоксазол,
 або сіль(i) або проліки або похідне(i) будь-якої чистоти або їх композиції з уповільненим
вивільненням для одночасного, окремого або послідовного застосування при лікуванні ALS або
спорідненого захворювання.
- 15 Інші додаткові методи лікування, які можуть використовуватися в комбінації з лікарською
комбінацією(ями) відповідно до даного винаходу, можуть включати один або більше лікарських
засобів, які полегшують симптоми ALS хвороби, один або більше лікарських засобів, які можуть
використовуватися для паліативного лікування хвороби ALS або один або більше лікарських
засобів, на даний час оцінених у рамках клінічних випробувань як спосіб лікування ALS хвороби.
- 20 Бажано, зазначений один або більше лікарських засобів обирають з поміж AEOL 10150,
аримокломола, AVP-923, токсину ботулізму типу В (Myobloc), цефтриаксону, целастазолу,
целекоксибу, глікозидів цистанхе, коензиму Q10, копаксону, креатину, креатиніну, дронабінолу,
еритропоетину, есциталопраму (Lexapro), глатирамер ацетату, колонієстимулюючого фактора
гранулоцитів (G-CSF), гормону росту (соматотропіну), GSK1223249, індинавіру,
- 25 інсуліноподібного фактора росту-1 (IGF-I), IGF-1-AAV, KNS-760704, летеприніму, леупроліду,
леветирацетаму, MCI-186, мекобаламуну, міноцикліну, модафінілу, інгібітору нааладази, N-
ацетилцистеїну, NBQX, німесулід, німодипіну, оланзапіну, олезоксиму (TRO19622), ONO-2506,
оксепу, піоглітазону, R(+) праміпексол дигідрохлорид моногідрату, олесоксиму, оксандролону,
хінідину, фенілбутирату, SB-509, скриптаїду, sNN0029, соматропіну, талампанелу, тамоксифену,
- 30 тауроурсодеоксихолевої кислоти, TCH346, тестостерону, талідоміду, трегалози, третиніну,
вітаміну Е, YAM80 або з 17-бета-естрадіолу, 2-MPPA (2-(3-меркаптопропіл)пентандієвої
кислоти), 3,4-діамінопіридину, 5-гідрокситриптофану, 7-нітроіндазолу, альфа-ліпоевої кислоти,
AM1241, амінофіліну, ангіоганіну, антитіл анти-людини SOD1, антизначеннєвий пептид-
нуклеїнової кислоти, спрямованої проти p75(NTR), AP7, апоцинину, BAPTA-AM, BDNF, BN82451,
- 35 канабінолу, кардіотрофіну-1, антитіла CD4, CNTF, колівеліну, харчової міді, кортикотропіну,
циклофосфаміду, дельта(9)-тетрагідроканабінолу, DHEA, диазепаму, харчового цинку,
дилтіазему, DMPO, DP-109, DP-460, едаравону, EGCG, епугалокатехун-галату, етидронату,
FeTCPP, флувоксаміну, фолієвої кислоти, габапентину, галектину-1, GDNF, гинсенгу, GPI-1046,
гуанідину, HGF, хуманіну, IFN-альфа, інтерлейкіну-3, івермектину, L-745,870, L-карнітину, L-
- 40 DOPA, лецитинізованої SOD, леналідоміду, леупептину, LIF, L-NAME, лізину ацетилсаліцилату,
мелатоніну, мепівакаїну, метамфетаміну, метилкобаламіну, MK-801, MnTBAP, модафінілу,
морфіну, Neu2000, NGF, нордигідрогваярєтової кислоти, нортриптиліну, NT3, олмесартану,
пеніциламіну, пентоксифіліну, пимозиду, поліамін-модифікованої каталази, праміпексолу,
преднізону, прогестерону, прометазину, путресцин-модифікованої каталази, пірувату,
- 45 разагіліну, RK35, Ro 28-2653, рофекоксибу, RPR 119990, RX77368, SB203580, селегіліну,
семапімоду, сертраліну, SS-31, SSR180575, стабілізованої siRNA анти людської Cu, Zn-
супероксиддисмутази (SOD1), такролімуса, тамсулозину гідрохлориду, TAT-модифікованого Bcl-
X(L), TGF-бета2, тіанептину, триентину, TRO19622, U-74389F, VEGF, вінкрістину, WHI-P131,
WIN55,212-2, WX-340, халіпродену, ZK 187638 і zVAD-fmk.
- 50 Як було зазначено вище, кращі методи лікування запропоновані винаходом включають 2, 3,
4 або навіть більше різних активних сполук, які можуть бути необов'язково додатково об'єднані
або скомбіновані з іншими видами (видом) лікування. У комбінованій терапії цього винаходу
сполуки або лікарські засоби можуть бути введені до складу окремо або разом і вводяться
разом, окремо або послідовно.
- 55 Винахід також має відношення до способу лікування ALS хвороби або спорідненого
порушення, причому даний спосіб передбачає одночасне, роздільне або послідовне введення
суб'єктові, який цього потребує, описаної вище лікарської комбінації.
Лікарські засоби або композиції запропоновані винаходом можуть вводитися суб'єктові
багаторазово.
- 60 Композиції запропоновані винаходом в більшості випадків містять один або декілька

фармацевтично прийнятних носіїв або ексципієнтів.

Додаткова мета цього винаходу має відношення до застосування, щонайменше, двох лікарських засобів, обраних із групи, яка складається з акампросату, баклофену, цинакальцету, мексилетину, сульфізоксазолу й торасеміду для виробництва медикаменту для лікування ALS або спорідненого захворювання шляхом комбінованого, роздільного або послідовного введення суб'єктові, який цього потребує.

Додаткова мета цього винаходу має відношення до застосування, щонайменше, однієї з наступних лікарських комбінацій:

- баклофен і цинакальцет,
- цинакальцет і акампросат,
- баклофен і акампросат,
- баклофен і акампросат і торасемід,
- мексилетин і цинакальцет,
- торасемід і баклофен, або
- торасемід і сульфізоксазол,

для виробництва медикаменту для лікування ALS або спорідненого захворювання шляхом комбінованого, роздільного або послідовного введення суб'єктові, який цього потребує.

В окремому варіанті здійснення винахід також має відношення до застосування, щонайменше, одного лікарського засобу, обраного із групи, яка складається з акампросату, баклофену, цинакальцету, мексилетину, сульфізоксазолу й торасеміду в комбінації з рилузолем для виробництва медикаменту для лікування ALS або спорідненого захворювання шляхом комбінованого, роздільного або послідовного введення суб'єктові, який цього потребує.

Інший варіант здійснення має відношення до застосування, щонайменше, двох лікарських засобів, обраних із групи, яка складається з акампросату, баклофену, цинакальцету, мексилетину, сульфізоксазолу й торасеміду в комбінації з рилузолом для виробництва медикаменту для лікування ALS або спорідненої хвороби шляхом комбінованого, роздільного або послідовного введення суб'єктові, який цього потребує.

У більш конкретному варіанті здійснення цей винахід має відношення до застосування, щонайменше, однієї з наступних лікарських комбінацій:

- баклофен і цинакальцет,
- цинакальцет і акампросат,
- баклофен і акампросат,
- баклофен і акампросат і торасемід,
- мексилетин і цинакальцет,
- торасемід і баклофен, або
- торасемід і сульфізоксазол,

у комбінації з рилузолом для виробництва медикаменту для лікування ALS або спорідненого захворювання шляхом комбінованого, роздільного або послідовного введення суб'єктові, який цього потребує.

Додатковою метою цього винаходу є спосіб приготування фармацевтичної композиції, даний спосіб передбачає змішування вищевказаних сполук у відповідному ексципієнті або носії.

Лікування згідно з винаходом може надаватися вдома, у кабінеті лікаря, клініці, амбулаторному відділенні лікарні або лікарні, щоб лікар міг всебічно спостерігати за ефектами лікування й за необхідності корегувати терапію.

Тривалість лікування залежить від стадії хвороби, віку й стану пацієнта, і того, як пацієнт відповідає на лікування.

Крім того, людей, які мають підвищений ризик розвитку додаткового невропатичного порушення (наприклад, людей, генетично схильних або, які мають, наприклад, діабет, або проходять курс лікування із приводу онкологічного стану тощо), може одержувати профілактичне лікування, щоб полегшити або відтермінувати можливу невропатичну відповідь.

Дозування, частоту й спосіб введення кожного лікарського засобу можна контролювати незалежно. Комбіноване лікування може проводитися періодичними циклами, які включають періоди відпочинку, щоб організм пацієнта мав можливість відновитися від будь-яких дотепер непередбачених побічних ефектів. При цьому лікарські засоби можуть включатися до складу разом, так що обидва лікарських засоби вводяться пацієнтові під час одного введення.

Створення фармацевтичних композицій

Уведення кожного лікарського засобу комбінації може здійснюватися будь-якими придатними способами, які дають у результаті таку концентрацію лікарського засобу, яка, у комбінації з іншим компонентом, може поліпшити стан пацієнта.

Разом з тим, що активні інгредієнти комбінації можуть бути введені у вигляді хімічно чистих

речовин, кращим є введення їх у вигляді фармацевтичної композиції. Можливі варіанти композиції включають композиції, придатні для перорального, ректального, місцевого (включаючи трансдермальне, защічне й сублінгвальне), або парентерального (включаючи підшкірне, внутрішньом'язове, внутрішньовенне й внутрішньошкірне) введення.

Зазвичай ці фармацевтичні композиції призначаються пацієнтові в "упакуванні для пацієнта", що містить деяку кількість одиниць дозування або інших засобів для введення відміряних одноразових доз для застосування протягом певного періоду лікування в єдиному упакуванні, звичайно в блістерному упакуванні. Упакування для пацієнта має перевагу в порівнянні із традиційними рецептами (коли фармацевт відокремлює дозу фармацевтичного препарату, призначену для пацієнта, від неупакованої партії), яка полягає в тому, що пацієнт завжди має доступ до листка-вкладки, який міститься в упакуванні для пацієнта і який звичайно відсутній при використанні традиційних рецептів. Відомо, що додавання листівки-вкладки поліпшує дотримання пацієнтом призначень лікаря. Таким чином, винахід додатково включає фармацевтичну композицію, як раніше описано в даному документі, разом з пакувальним матеріалом, придатним для зазначених композицій. У такому упакуванні для пацієнта передбачене застосування композиції для комбінованого лікування може бути визначене за інструкціями, пристосуваннями, обладнанням і/або іншим засобом, призначеним для допомоги при використанні композиції найбільш придатним для лікування чином. Зокрема, такі заходи роблять упакування для пацієнта придатним й пристосованим для застосування при лікуванні комбінацією даного винаходу.

Лікарський засіб може утримуватися в будь-якій відповідній кількості в будь-якій придатній речовині-носії й може бути присутнім у кількості 1-99 % за вагою від загальної ваги композиції. Композиція може надаватися в лікарській формі, придатній для перорального, парентерального (наприклад, внутрішньовенного, внутрішньом'язового), ректального, шкірного, назального, вагінального, окулярного введення, введення за допомогою інгаляції або шкірного пластиру. Таким чином, композиція може перебувати у формі, наприклад, таблеток, капсул, пігулок, порошків, гранул, суспензій, емульсій, розчинів, гелів, включаючи гідрогелі, паст, мазей, кремів, пластирів, просочених серветок, осмотичних засобів доставки, супозиторіїв, клізм, ін'єкційних засобів, імплантованих пристроїв, спреїв або аерозолів.

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

Фармацевтичні композиції згідно з винаходом можуть створюватися так, щоб вивільняти активний лікарський засіб відразу ж після введення або в який-небудь певний час або період часу після введення.

Композиції з контрольованим вивільненням включають (i) композиції, які створюють практично постійну концентрацію лікарського засобу в організмі протягом тривалого періоду часу; (ii) композиції, які після певного періоду затримки створюють практично постійну концентрацію лікарського засобу в організмі протягом тривалого періоду часу; (iii) композиції, які підтримують дію лікарського засобу протягом заздалегідь визначеного періоду часу шляхом збереження відносно постійного ефективного рівня лікарського засобу в організмі разом з одночасною мінімізацією небажаних побічних ефектів, пов'язаних з коливаннями рівня в плазмі активної лікарської речовини; (iv) композиції, які визначають місце дію лікарського засобу, наприклад, за допомогою просторового розміщення композиції з контрольованим вивільненням поруч або біля хворої тканини або органу; і (v) композиції, які "націлюють" лікарський засіб за допомогою носіїв або хімічних похідних для доставки лікарського засобу в конкретний тип клітинок-мішеней.

Уведення лікарських засобів у формі композицій з контрольованим вивільненням є особливо бажаним в тих випадках, коли лікарський засіб у комбінації має: (i) вузький терапевтичний діапазон (тобто, різниця між концентрацією в плазмі, що приводить до шкідливих побічних ефектів або токсичних реакцій, і концентрацією в плазмі, що приводить до терапевтичного ефекту, є невеликою; загалом, терапевтичний індекс, TI, визначається як відношення середньої летальної дози (LD_{50}) до середньої ефективної дози (ED_{50})); (ii) вузьке вікно поглинання в шлунково-кишковому тракті; або (iii) дуже короткий біологічний період напівжиття, такий, що протягом дня потрібне часте дозування для підтримання терапевтичного рівня в плазмі.

Може бути здійснена кожна із цілого ряду стратегій, для того, щоб одержати контрольоване вивільнення, при якому швидкість вивільнення перевершує рівень метаболізму розглянутого лікарського засобу. Контрольоване вивільнення може бути отримане шляхом вибору різних параметрів і інгредієнтів композиції, включаючи, наприклад, різні типи композицій з

контрольованим вивільненням і покриття. Таким чином, лікарський засіб входить до складу фармацевтичної композиції разом з придатними ексципієнтами, при цьому після введення композиція контрольованим чином вивільняє лікарський засіб (композиції у вигляді однієї або багатьох таблеток або капсул, олійного розчину, суспензії, емульсії, мікрокапсул, мікросфер, наночасточки, пластиря та ліпосоми).

Тверді лікарські форми для перорального застосування

Кращим способом введення цилостазолу й рилузолу є пероральний прийом. Композиції для перорального застосування включають таблетки, які містять активний інгредієнт(и) у суміші з нетоксичними фармацевтично прийнятними ексципієнтами. Ці ексципієнти можуть бути, наприклад, інертними ексципієнтами або наповнювачами (основами) (наприклад, сахароза, мікрокристалічна целюлоза, крохмалі, включаючи кукурудзяний крохмаль, карбонат кальцію, хлорид натрію, фосфат кальцію, сульфат кальцію або фосфат натрію); речовинами, що розпушують і гранулюють (наприклад, похідні целюлози, включаючи мікрокристалічну целюлозу, крохмалі, включаючи кукурудзяний крохмаль, кроскармелозу натрію, альгінати або альгінову кислоту); з'єднувальними речовинами (наприклад, гуміарабік, альгінова кислота, альгінат натрію, желатин, крохмаль, прежелатинізований крохмаль, мікрокристалічна целюлоза, натрій карбоксиметилцелюлоза, метилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза, етилцелюлоза, полівінілпіролідон або поліетиленгліколь); і змашувальними речовинами, речовинами, які сприяють ковзанню, і антиадгезійними речовинами (наприклад, стеаринова кислота, діоксид кремнію або тальк). Інші фармацевтично прийнятні ексципієнти можуть бути барвниками, смаковими речовинами, пластифікаторами, зволожувальними речовинами, буферними речовинами тощо.

Таблетки можуть бути таблетками без оболонки або вони можуть бути покриті оболонкою за допомогою відомих методів, необов'язково щоб уповільнити руйнування й всмоктування в шлунково-кишковому тракті й у такий спосіб забезпечити пролонговану дію протягом більш тривалого періоду часу. Покриття може бути виконане так, щоб вивільняти активну лікарську речовину наперед визначеним чином (наприклад, щоб одержати композицію з контрольованим вивільненням) або воно може бути виконане так, щоб вивільняти активну лікарську речовину тільки після проходження шлунка (ентеросолюбільне покриття). Покриття може бути шаром цукрової глазури, плівковою оболонкою (наприклад, на основі гідроксипропіл метилцелюлози, метилцелюлози, метил гідроксиетилцелюлози, гідроксипропілцелюлози, карбоксиметилцелюлози, акрилатних співполімерів, поліетиленгліколей і/або полівінілпіролідону), або ентеросолюбільне покриття (наприклад, на основі співполімерів метакрилової кислоти, ацетатфталату целюлози, фталату гідроксипропілметилцелюлози, ацетатсукцинату гідроксипропілметилцелюлози, полівінілацетату фталат, шелаку й/або етилцелюлози). Можуть використовуватися матеріали, які забезпечують затримку в часі, такі як, наприклад, гліцерил моностеарат або гліцерил дистеарат.

Тверді композиції у вигляді таблеток можуть включати покриття, пристосовані для захисту композиції від небажаних хімічних змін (наприклад, хімічної деградації до вивільнення активної лікарської речовини). Покриття може наноситися на тверду лікарську форму таким способом, як описано в Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.

Лікарські засоби можуть бути змішані разом у таблетці або можуть бути розділені. Наприклад, перший лікарський засіб міститься на внутрішній стороні таблетки, а другий лікарський засіб перебуває на зовнішній поверхні, так що значна частина другого лікарського засобу вивільняється до вивільнення першого лікарського засобу.

Композиції для перорального застосування також можуть надаватися у вигляді жувальних таблеток або твердих желатинових капсул, у яких активний інгредієнт змішується з інертною твердою основою (наприклад, картопляним крохмалем, мікрокристалічною целюлозою, карбонатом кальцію, фосфатом кальцію й каоліном), або у вигляді м'яких желатинових капсул, у яких активний інгредієнт змішується з водою або олійним середовищем, наприклад, рідким парафіном або маслиною олією. Порошки й гранули можна приготувати звичайним чином, використовуючи інгредієнти, згадані вище для таблеток і капсул.

Композиції з контрольованим вивільненням для перорального застосування, можуть, наприклад, бути створені так, щоб вивільнення активної речовини контролювалося розчиненням і/або дифузією активної лікарської субстанції.

Вивільнення, контрольоване розчиненням або дифузією, може бути досягнуте за допомогою відповідного покриття таблеток, капсул, драже або гранул композиції лікарських засобів, або шляхом включення лікарського засобу в придатну матрицю. Покриття, яке контролює вивільнення може включати один або більше із покриваючих матеріалів, згаданих вище й/або, наприклад, шелак, бджолиний віск, гліковоск, гідровану касторову олію, карнаубський віск,

стеариловий спирт, гліцерил моностеарат, гліцерил дистеарат, гліцерин пальмітостеарат, етилцелюлозу, акрилові смоли, dl-полімолочну кислоту, ацетобутират целюлози, полівініл хлорид, полівініл ацетат, вінілпіролідон, поліетиленгліколь, поліметакрилат, метилметакрилат, 2-гідроксиметакрилат, метакрилатні гідрогелі, 1,3-бутиленгліколь, етиленгліколь метакрилат і/або поліетиленгліколі. У матричних композиціях з контрольованим вивільненням матеріал матриці також може включати, наприклад, гідратовану метилцелюлозу, карнаубський віск і стеариловий спирт, карбопол 934, силікон, гліцерил тристеарат, метил акрилат-метил метакрилат, полівініл хлорид, поліетиленгліколь і/або галоїдований фторуглерод.

Композиція з контрольованим вивільненням, що містить один або більше лікарських засобів заявлених комбінацій, також може мати форму "плаваючої" таблетки або капсули (тобто, таблетки або капсули, яка після перорального введення, плаває на поверхні вмісту шлунка протягом певного періоду часу). Композиція "плаваючої" таблетки лікарського засобу(засобів) може бути отримана гранулюванням суміші лікарського засобу(засобів) з ексципієнтами й гідроколоїдами 20-75 % маса/маса, такими як гідроксиетилцелюлоза, гідроксипропілцелюлоза або гідроксипропіл-метилцелюлоза. Потім отримані гранули можуть бути спресовані в таблетки. При контакті зі шлунковим соком таблетка утворює практично водонепроникний гелевий бар'єр навколо своєї поверхні. Цей гелевий бар'єр бере участь у збереженні щільності, що дозволяє таблетці плавати в шлунковому соку.

Рідини для перорального введення

Порошки, дисперговані порошки або гранули, придатні для приготування водної суспензії шляхом додавання води, є зручними лікарськими формами для перорального введення. Композиція у вигляді суспензії надає активний інгредієнт у суміші з диспергувальною або зволожуючою речовиною, суспендувальною речовиною й одним або більше консервуючими речовинами. Придатними суспендувальними речовинами є, наприклад, натрій карбоксиметилцелюлоза, метилцелюлоза, альгінат натрію тощо.

Парентеральні композиції

Хоча це і є менш бажаним, фармацевтична композиція також може бути введена парентерально за допомогою ін'єкції, інфузії (вливання) або імплантації (внутрішньовенної, внутрішньом'язової, підшкірної тощо) у готових лікарських формах, композиціях або за допомогою придатних пристроїв для доставки або імплантатів, що містять звичайні, нетоксичні фармацевтично прийнятні носії й ад'юванти (допоміжні речовини). Склад і приготування таких композицій добре відомі фахівцям в галузі створення фармацевтичних препаратів.

Композиції для парентерального введення можуть надаватися в стандартних лікарських формах (наприклад, в ампулах з одноразовою дозою), або у флаконах, що містять кілька доз, у які може бути доданий придатний консервант (дивися нижче). Композиція може мати форму розчину, суспензії, емульсії, інфузійного пристрою або імплантованого пристрою або може мати вигляд сухого порошку, призначеного для відновлення водою або іншим придатним розріджувачем перед застосуванням. Крім активного лікарського засобу (засобів) композиція може включати придатні парентерально прийнятні носії й/або ексципієнти. Активний лікарський засіб (засоби) можуть бути розфасовані в мікросфери, мікрокапсули, мікрочастинки, ліпосоми й таке інше для контрольованого вивільнення. Композиція може включати суспендуючі, солюбілізуючі, речовини, які, стабілізують, регулюють значення рН і/або диспергуючі речовини.

Фармацевтичні композиції згідно з винаходом можуть бути у формі, придатній для здійснення стерильного введення. Для одержання такої композиції придатний активний лікарський засіб (засоби) розчиняють або суспендують у парентерально прийнятному рідкому розріджувачі. До прийнятних розріджувачів і розчинників, які можна використовувати, відносяться вода, вода з придатним значенням рН, відрегульованим шляхом додавання відповідного кількості соляної кислоти, гідроокису натрію або придатного буфера, 1,3-бутандіол, розчин Рінгера й ізотонічний розчин хлориду натрію. Водна композиція може також містити одну або більше консервуючих речовин (наприклад, метил, етил або n-пропіл p-гідроксибензоат). У тих випадках, коли лікарський засіб є помірно або слабозрочним у воді, може бути доданий агент, який посилює розчинення або солюбілізуючий агент, або розчинник може включати 10-60 % маса/маса пропіленгліколю або тому подібного.

Парентеральні композиції з контрольованим вивільненням можуть мати форму водних суспензій, мікросфер, мікрокапсул, магнітних мікросфер, олійних розчинів, олійних суспензій або емульсій. Альтернативно, активний лікарський засіб(а) може бути поміщено (вбудовано) у біосумісні носії, ліпосоми, наночасточки, імплантати або інфузійні пристрої. Матеріалами, які використовуються при одержанні мікросфер або й/або мікрокапсул, є, наприклад, полімери, здатні до біологічної деградації/розкладу, такі як полігалактин, полі-(ізобутил ціаноакрилат), полі(2-гідроксиетил-L-глутамін). Біосумісними носіями, які використовуються при створенні

парентеральних композицій з контрольованим вивільненням, є вуглеводи (наприклад, декстрини), білки (наприклад, альбумін), ліпопротеїни або антитіла. Матеріали, які використовуються в імплантатах можуть бути не здатні до біологічної деградації (наприклад, полідиметилсилоксан) або здатні до біологічної деградації (наприклад, полі(капролактон), полі(гліколева кислота) або полі(ортоєфіри)).

Альтернативні способи

Можуть бути передбачені менш бажані й менш зручні інші способи введення й, отже, інші композиції. З цього погляду придатні лікарські форми для ректального застосування композицій, включають супозиторії (суспензійного або емульсійного типу) і ректальні желатинові капсули (які містять розчини або суспензії). У типовій композиції для супозиторіїв активний лікарський засіб(а) комбінується з придатною фармацевтично прийнятною основою, такою як масло какао, етерифіковані жирні кислоти, желатин із гліцерином і різні водорозчинні або дисперговані основи, такі як поліетиленгліколі. Можуть включатися різні допоміжні речовини, підсилювачі або поверхнево-активні речовини.

Фармацевтичні композиції також можуть вводитися місцево в шкіру для усмоктування через шкіру в лікарських формах або композиціях, що звичайно містять нетоксичні фармацевтично прийнятні носії й ексципієнти, включаючи мікросфери й ліпосоми. Такі композиції включають креми, мазі, лосьйони, лініменти, гелі, гідрогелі, розчини, суспензії, контурні безкоміркові упакуння, спреї, пасти, пластирі та інші види систем для трансдермальної доставки лікарських засобів. Фармацевтично прийнятні носії або ексципієнти можуть включати емульгуючі речовини, антиоксиданти, буферні речовини, консервуючі речовини, зволожуючі речовини, речовини, які підсилюють проникнення, хелатуючі агенти, гелеутворюючі речовини, мазеві основи, ароматизуючі речовини та речовини, які захищають шкіру.

Емульгуючі речовини можуть бути камедями природного походження (наприклад, гуміарабіком або трагакантовою камеддю).

Консервуючими речовинами, зволожуючими речовинами, речовинами, які підсилюють проникнення можуть бути парабени, такі як метил або пропіл р-гідроксибензоат, і бензалконій хлорид, гліцерин, пропіленгліколь, сечовина тощо.

Фармацевтичні композиції, описані вище, призначені для місцевого застосування на шкірі також можуть використовуватися разом з місцевим введенням в тій частині тіла, яка потребує лікування або біля неї. Композиції можуть бути пристосовані для безпосереднього застосування або застосування за допомогою спеціальних пристосувань для доставки лікарського засобу, таких як пов'язки або пластирі, подушечки, губки, контурні безкоміркові упакуння або інші форми з придатного гнучкого матеріалу.

Дозування й тривалість лікування

Слід розуміти, що лікарські засоби комбінації можуть вводитися одночасно, в одній і тій же або в різних фармацевтичних композиціях, або послідовно. При послідовному введенні відтермінування введення одного з активних інгредієнтів не повинне приводити до втрати позитивного ефекту комбінації активних інгредієнтів. Мінімальна вимога до комбінації згідно з даним описом полягає в тому, що комбінація повинна призначатися для комбінованого застосування з урахуванням користі, яка може бути одержана від комбінації активних інгредієнтів. Передбачене застосування комбінації може бути визначене за пристосуваннями, обладнанням і/або іншим засобами, призначеними для допомоги при використанні комбінації згідно з винаходом.

Терапевтично ефективна кількість цилостазолу є кількістю, придатною для запобігання або зменшення ризику розвитку ALS хвороби й зупинення або уповільнення прогресування ALS хвороби після того, як вона стає клінічно очевидною.

Кращими прикладами дозувань згідно з винаходом є:

- мексилетин: приблизно від 6 до 120 мг на день, бажано, менше ніж 60 мг на день, більш бажано, менше ніж 30 мг на день, навіть більш бажано, менше ніж 15 мг на день, зокрема, такі дозування придатні для перорального введення,

- торасемід: приблизно від 0,05 до 4 мг на день, бажано, менше ніж 2 мг на день, більш бажано, менше ніж 1 мг на день, навіть більш бажано, менше ніж 0,5 мг на день, зокрема, такі дозування придатні для перорального введення,

- акампросат: приблизно від 1 до 1000 мг на день, бажано, менше ніж 400 мг на день, більш бажано, менше ніж 200 мг на день, навіть більш бажано, менше ніж 50 мг на день, або навіть менше ніж 10 мг на день, зокрема, такі дозування придатні для перорального введення,

- баклофен: приблизно від 0,01 до 150 мг на день, бажано, менше ніж 100 мг на день, більш бажано, менше ніж 50 мг на день, навіть більш бажано, менше ніж 30 мг на день, зокрема, такі дозування придатні для перорального введення,

- цинакальцет: приблизно від 0,3 до 150 мг на день, більш бажано, менше ніж 100 мг на день, навіть більш бажано, менше ніж 36 мг на день, зокрема, такі дозування придатні для перорального введення,

5 - сульфізоксазол: приблизно від 20 до 800 мг на день, зокрема, такі дозування придатні для перорального введення,

- рилузол: приблизно від 0,01 до 100 мг на день, бажано, менше ніж 75 мг на день, більш бажано, менше ніж 50 мг на день, навіть більш бажано, менше ніж 25 мг на день, зокрема, такі дозування придатні для перорального введення.

10 Слід розуміти, що кількість лікарського засобу, яка фактично вводиться, буде визначатися лікарем у світлі відповідних обставин, включаючи стан або стани, які необхідно лікувати, конкретну композицію, що вводиться, вік, вагу й реакцію окремого пацієнта, тяжкість симптомів у пацієнта й обраний спосіб уведення. Крім того, на дозування, яке використовується може впливати фармакогеномна інформація про конкретного пацієнта (дія генотипу на фармакокінетику, фармакодинаміку й профіль ефективності терапевтичного засобу). Тому, зазначені вище межі дозувань надаються з метою забезпечення загальної рекомендації й підтримки представленої в описі ідеї, і не призначені для обмеження рамок винаходу.

Хоча активні лікарські засоби даного винаходу можуть уводитися роздільними дозами, наприклад, два або три рази на день, кращою є одна щоденна доза кожного лікарського засобу в комбінації, при цьому одна щоденна доза всіх лікарських засобів в одній фармацевтичній композиції (стандартна лікарська форма) є найкращою. Термін "стандартна лікарська форма" 20 відноситься до фізично дискретних одиниць (таких як капсули, таблетки або заповнені циліндри шприців), придатних як одноразові дозування для людини, причому кожна одиниця містить визначену кількість активного засобу або засобів, обчислену з метою одержання бажаного терапевтичного ефекту, у комбінації з необхідним фармацевтичним носієм.

25 Уведення може здійснюватися від одного до декількох разів на день, протягом від декількох днів до декількох років і навіть протягом усього життя пацієнта. Постійне або, щонайменше тривале введення, що періодично повторюється, буде рекомендуватися в більшості випадків.

У найкращому варіанті здійснення комбінації запропоновані винаходом використовуються в комбінації з рилузолом, при цьому всі лікарські засоби вводять перорально. При використанні 30 такого протоколу рилузол бажано вводиться систематично, наприклад, щодня, краще з щоденним дозуванням 0,01-100 мг на день, навіть більш бажано з щоденним дозуванням 0,1-100 мг на день, найкраще в межах 0,1-50 мг на день, а інші лікарські засоби у зазначених вище дозуваннях.

Лікарські засоби можуть уводитися одночасно, тобто приблизно в той саме час, хоча 35 необов'язково точно в той же саме час або шляхом використання тієї ж самої композиції. Зокрема, рилузол може бути введений до складу окремо від інших лікарських засобів, при цьому всі лікарські засоби пацієнт приймає приблизно в то саме час дня, щоб забезпечити їх присутність і дію в комбінації в організмі. Також може бути встановлений терапевтичний протокол, коли рилузол уводиться по черзі з комбінацією, яка містить, щонайменше, два 40 лікарські засоби, обрані з поміж акампросату, баклофену, цинакальцету, мексилетину, сульфізоксазолу й торасеміду (наприклад, в один день уводиться рилузол, наступного дня зазначена комбінація і так далі). Слід зазначити, що різні протоколи можуть бути відрегульовані або встановлені лікарем, щоб забезпечити найбільш ефективну для кожного пацієнта комбіновану терапію запропоновану винаходом.

45 Наступні приклади надаються з метою ілюстрації, а не з метою обмеження.

Приклади

Захисна дія лікарських комбінацій на моделях ALS.

Комбіноване лікування відповідно до даного винаходу тестували *in vitro*, на клітинах кори головного мозку пацюка, на моделі спільної нервово-м'язової культури й на мишачій моделі ALS 50 *in vivo*. Протоколи й результати представлені в цьому розділі.

Усі експерименти на тваринах були проведені згідно з рекомендаціями Національного інституту охорони здоров'я (NIH) щодо догляду й використання лабораторних тварин і були схвалені Національним комітетом з використання експериментальних тварин.

1. Захисний ефект від токсичності глутамату на первинних культурах нейронів.

55 Токсичність глутамату залучена в патогенез ALS. У цих експериментах сполуки-кандидати були перевірені щодо їх здатності запобігати або зменшувати токсичні ефекти глутамату на нейрони. Лікарські засоби спочатку перевірили окремо, а потім досліджували їхню комбіновану дію.

Одержання нейронів

60 Ефективність лікарських комбінацій запропонованих винаходом спочатку оцінювали на

первинних кортикальних нейронах.

Кортикальні нейрони пацюків культивували, як описано Singer et al. (38). Коротко, вагітних самок пацюків (15-денна вагітність) забивали зміщенням шийних хребців (Rats Wistar) і вилучали з матки плоди. Кору головного мозку вилучали й поміщали в охолоджене до 0° середовище Leibovitz (L15), яке містить 2 % пеніциліну 10000 U/мл і стрептоміцину 10 мг/мл і 1 % бичачого сироваткового альбуміну (BSA). Кору головного мозку дисоціювали трипсином протягом 30 хвилин при 37°C (0.05 %). Реакцію зупиняли додаванням середовища Ігла, модифікованого способом Дульбекко (DMEM), яке містить ДНКазу1 II ступеня чистоти й 10 % ембріональною бичачою сироваткою (FCS). Потім клітини механічно дисоціювали 3 серійними пасажами за допомогою піпетки 10 мл і центрифугували при 515 × g протягом 10 хв. при +4 °C. Супернатант відкинули, а клітинний осад ресуспендували в певному культуральному середовищі, яке складається з Neurobasal з додаванням B27 (2 %), L-глутаміну (0,2 мМ), 2 % розчину PS і 10 нг/мл BDNF. Живі клітини підраховували, використовуючи тест витиснення трепанового синього, на цитометрі Neubauer. Клітини висівали при щільності 30000 клітин/комірку в 96-комірковій планшети (комірки були попередньо покриті полі-L-лізином (10 мкг/мл)) і культивували при +37 °C у вологій атмосфері (95 %)/CO₂ (5 %).

Дослідження токсичності глутамату

Нейропротективну дію сполук оцінювали за допомогою кількісного аналізу мережі нейритів (імунофарбування нейрофіламентів (NF)), який специфічно виявляє глутаматергічні нейрони.

Через 12 днів культивування нейронів у культуральному середовищі розчиняли лікарські засоби комбінацій-кандидатів (+0,1 % DMSO). Потім комбінації-кандидати попередньо інкубували з нейронами протягом 1 години до пошкодження глутаматом. Через годину інкубації додавали глутамат на 20 хвилин, до остаточної концентрації 40 мкМ, у присутності комбінацій-кандидатів, для того щоб уникнути додаткового розбавлення лікарських засобів. Наприкінці інкубації середовище заміняли середовищем з комбінацією-кандидатом, але без глутамату. Культуру фіксували через 4 години після пошкодження глутаматом. MK801 (дізоцилпінгідроген малеат, 77086-22-7 – 20 мкМ) використовували як позитивний контроль.

Після пермеабілізації сапоніном (Sigma) клітини протягом 2 годин блокували PBS, що містить 10 % козячої сироватки, потім клітини інкубували з мишачими моноклональними первинними антитілами проти нейрофіламентів (NF, Sigma). Це антитіло було виявлено за допомогою Alexa Fluor 488 козячого анти-миша IgG.

Ядра клітин мітили флуоресцентним маркером (розчин Хекста, SIGMA), і визначали кількість нейритів. Використовували шість комірок на точку для оцінки виживання нейронів в 3 різних культурах.

Результати

Усі перевірені лікарські комбінації демонстрували захисний ефект від токсичності глутамату відносно кортикальних нейронів. Результати показані в таблиці 2 нижче.

Як проілюстровано на Фігурах 1, 3 і 4, комбінації запропоновані винаходом явно захищають нейрони від токсичності глутамату за описаних вище умов експерименту. Варто відзначити, що ефективний захист відзначається при використанні таких концентрацій лікарських засобів, які при роздільному застосуванні лікарських засобів не демонструють значного захисного ефекту або показують більш низький захисний ефект.

Дійсно, як проілюстровано на Фігурі 3, комбінація мексилетин - цинакальцет ефективно захищає нейрони від токсичності глутамату, тоді як лікарські засоби окремо не забезпечують захист. Комбінація баклофен - акампросат (Фігура 1) проявляє захисну дію від токсичності глутамату відносно нейронів. Комбінація баклофену й акампросату викликає поліпшення більше, ніж на 200 %, у порівнянні з окремо акампросатом й більше, ніж на 47 %, у порівнянні з використанням окремо баклофену.

Таблиця 2

Лікарська комбінація	Нейропротективний ефект від токсичності глутамату
баклофен і торасемід	+
баклофен-акампросат-торасемід	+
мексилетин і цинакальцет	+
сульфізоксазол і торасемід	+
баклофен і акампросат	+
акампросат і цинакальцет	+
баклофен і цинакальцет	+

2. Захисний ефект від токсичності глутамату на первинних спільних нервово-м'язових культурах

Первинні спільні культури нервових і м'язових клітин

М'язову тканину людини одержували відповідно до раніше описаного методу з біопсійного матеріалу здорового суб'єкта (39). М'язові клітини одержували з дисоційованих клітин (20000 клітин на комірку), висіяних на покриті желатином 0,1 % 48-коміркові планшети й вирощених у середовищі для проліферації, яке складається із суміші 75 % середовища MEM із середовищем 25 % M199 з додаванням глутаміну 2 мМ, бичачого інсуліну 10 мкг/мл, людського рекомбінантного епідермального фактора росту 10 нг/мл, людського рекомбінантного основного фактора росту фібробластів 2 нг/мл, ембріональної бичачої сироватки 10 % (FCS) і 2 % пеніциліну 10000 U/мл і стрептоміцину (10 мг/мл).

Відразу після злиття сателітних клітин, цілі поперечні зрізи спинного мозку ембріонів пацюків Wistar 13-денного віку разом з 4 прикріпленими дорсальними корінцевими гангліями (DRG) поміщали на м'язовий моношар (один експлантат на комірку, у центр поверхні). DRG необхідно досягти гарного ступеня іннервації. Іннервовані культури підтримували в змішаному середовищі (75 % MEM і 25 % M199) з додаванням глутаміну 2 мМ, 5 % FCS, бичачого інсуліну 5 мкг/мл і 2 % пеніциліну 10000 U/мл і стрептоміцину (10 мг/мл).

Було видно, що через 24 години спільного культивування з експлантатів спинного мозку проростають нейрити. Вони приходять у контакт із м'язовими трубочками й викликають перше скорочення приблизно через 8 днів. Незабаром після цього іннервовані м'язові волокна, розташовані поблизу експлантатів спинного мозку, практично постійно скорочуються. Іннервовані волокна морфологічно й просторово відрізняються від неіннервованих волокон, і їх легко можна розрізнити.

Пошкодження глутаматом

На 27 день спільні культури інкубували із сполуками-кандидатами, їх комбінаціями або рилузолем за одну годину до інтоксикації глутаматом (60 мкМ) протягом 20 хв. Потім, спільні культури відмивали й додавали сполуки-кандидати, їх комбінації й/або рилузол додатково на 48 годин. Після цього часу інкубації нефіксовані спів-культури інкубували з α -бунгаротоксином у комбінації з Alexa 488 при концентрації 500 нмоль/л протягом 15 хвилин за кімнатної температури. Потім, спільні культури фіксували PFA протягом 20 хвилин за кімнатної температури. Після пермеабілізації 0,1 % сапоніном спів-культури інкубували з мишачими моноклональними антитілами до нейрофіламентів (NF, розбавлення 1/400).

Ці антитіла виявляли за допомогою Alexa Fluor 568 козячого анти-мишачого IgG (молекулярний зонд, 1/400 розбавлення), ядра нейронів мітили флуоресцентним маркером (розчин Хекста, 1 мкг/мл у тому ж розчині).

Кінцевими критеріями оцінки є (1) загальна довжина нейриту, (2) число моторних одиниць, (3) загальна площа моторних одиниць, які є показниками виживання й функціонування мотонейронів.

У кожному стані роблять зображення 2×10 на комірку, використовуючи Incell Analyzertm 1000 (GE Healthcare) при збільшенні 20 \times . Усі зображення робляться за однакових умов.

Пошкодження глутаматом з попередньою обробкою рилузолем

На 23 день (тобто 4 дня попередньої обробки) спільні культури інкубували з рилузолем. Через 4 дня (тобто на день 27) за одну годину до додавання глутамату додали лікарські комбінації, а потім додали глутамат (60 мкМ) на 20 хвилин. Потім спільні культури обробляли для проведення імуофлуоресцентного аналізу, як зазначено вище.

Результати

Значний захист відзначається за всіма трьома критеріями оцінки при використанні в комбінації лікарських засобів у таких концентраціях, які при використанні засобів окремо ефекту не дають. Досліджені комбінації ліків перераховано в таблиці 3 і проілюстровано на Фігурі 2. Ця несподівана синергійна дія дозволяє використовувати лікарські засоби в настільки низьких дозах, що можна уникнути можливих побічних ефектів.

Таблиця 3

Лікарська комбінація	Захисний ефект від інтоксикації глутаматом у спільних нервово-м'язових культурах
баклофен і цинакальцет	+
цинакальцет і акампросат	+
баклофен-торасемід	+
баклофен-акампросат-торасемід	+
мексилетин і цинакальцет	+
сульфізоксазол і торасемід	+
баклофен і акампросат	+

Лікарські комбінації запропоновані винаходом збільшують захисний ефект рилузолу відносно токсичності глутамату на моделі *in vitro* за трьома критеріями оцінки (таблиця 4).

5

Таблиця 4

Лікарська комбінація	Посилення захисного ефекту рилузолу від інтоксикації глутаматом у спільних нервово-м'язових культурах
баклофен-цинакальцет-рилүзол	+
цинакальцет-акампросат-рилүзол	+
баклофен-торасемід-рилүзол	+
акампросат-торасемід-рилүзол	+
мексилетин-цинакальцет-рилүзол	+
сульфізоксазол-торасемід-рилүзол	+
баклофен-акампросат-рилүзол	+

Винахідники виявили, що комбінації запропоновані винаходом підсилюють захисну дію рилузолу на моделі спільної нервово/ м'язової культури. Дійсно, додавання до рилузолу комбінації баклофен-акампросат при лікуванні клітин, які зазнали інтоксикації глутаматом у результаті призводить до посилення захисту клітин. Більше того, як показано на Фігурі 5, винахідники встановили концентрації лікарських засобів, при яких цей ефект є особливо значним (акампросат 0,14 нМ і баклофен 36 нМ).

10

Як проілюстровано на Фігурі 6, лікарська комбінація запропонована винаходом діє синергійно з рилузолом відносно захисту нервово-м'язових з'єднань від токсичності глутамату. Особливо слід зазначити, що додавання суміші баклофен-акампросат у ледь ефективних дозах (36 нМ і 0,14 нМ баклофену й акампросату, відповідно) у культуральне середовище клітин, оброблених рилузолом, дає в результаті майже подвійний (або навіть більше) захисний ефект рилузолу від пошкодження глутаматом.

15

Таким чином, композиції запропоновані винаходом є ефективними, зокрема, як допоміжна терапія при інших видах лікування ALS (зокрема, рилузолом) або можливих видах лікування ALS.

20

3. Комбіноване лікування є ефективним на мишачій моделі ALS

У цій серії експериментів, щоб імітувати ALS, були обрані трансгенні гетерозиготні миші B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J і миші WT (штам 1012, JAX). У хворих мишей спостерігалася експресія SOD1-G93A трансгена, створеного з використанням мутантного людського SOD1 гена (заміна однієї амінокислоти -гліцину на аланін - у кодоні 93) під впливом його ендегенного людського SOD1 промотору.

25

Тварин утримували за стандартної температури (22 °C±1 °C) за умов регульованого освітлення (день від 7 am до 8 pm) з вільним доступом до їжі й води *ad libitum*. Починаючи з віку 100 днів усі миші G93A SOD1 одержували вологу порошкоподібну їжу (стандартна лабораторна дієта, змішана з водою для одержання пасти), причому поживний гель поміщали в клітки. Крім того, водяні фонтанчики були оснащені розширеннями на рівні підлоги для забезпечення легкого доступу.

30

Уведення лікарського препарату

Мишам вводили дози розбавлених у розріджувачі лікарських засобів-кандидатів, починаючи з 60^{ого} дня після народження до досягнення 150-денного віку. Розбавлені (водою) розчини лікарських засобів-кандидатів готували за кімнатної температури безпосередньо перед

35

уведенням. І рилузол і лікарські комбінації вводили per os. Як розріджувач використовували циклодекстрин в остаточній концентрації 5 %, розбавлений у воді за кімнатної температури зі стокового розчину (циклодекстрин 20 %). Обробку лікарськими комбінаціями (10 мл/кг) і розріджувачем починали в 60-денному віці й продовжували до досягнення мишами 150-денного віку. Лікарські комбінації вводили p.o. BID між 8-11 am і 4-7 pm.

Постановка експерименту на мишах

При підготовці груп для дослідження (тобто груп, які оброблялись досліджуваною або контрольною речовиною) трансгенних мишей випадковим чином ділили на групи так, що цілі виводки мишей ніколи не попадали в одну дослідну групу, що давало можливість уникнути "ефектів одного виводку" на остаточні результати. Крім того, у групах було врівноважене співвідношення самців і самок.

Самок мишей розміщали в групах максимум по 5, а самців містили по одному. Мишам давали можливість звикнути до експериментальної кімнати, щонайменше, протягом однієї години до початку будь-якого експерименту. Мишей переносили в експериментальні кімнати в їхніх домашніх клітках.

Вага тіла

Показано, що втрата ваги добре корелює з розвитком хвороби й легко підраховується в балах разом зі стадіями хвороби. Мишей зважували один раз на тиждень у той самий день тижня (понеділок) у віці 60-91 днів і три рази на тиждень (понеділок-середа-п'ятниця) після досягнення віку 91 день (13 тижнів).

Клінічна оцінка в балах

В оригінальній статті (40), яка описує одержання SOD1-G93A мишей, повідомляється про ранній початок хвороби (~100 днів), швидке погіршення й досягненні кінцевої стадії в уражених мишей у середньому в межах 40 днів (зазвичай виживання 130-150 днів). Тому, мишей ретельно обстежували, використовуючи клінічний підрахунок балів, як описано нижче, один раз на тиждень (понеділок) до 91-денного віку й три рази на тиждень (понеділок-середа-п'ятниця) після досягнення 91-денного віку.

Ранніми клінічними ознаками є тремор і тремтіння кінцівок, коли мишей ненадовго піднімають у повітря за хвіст. Система клінічного підрахунку в балах – це шкала від 1 до 5; 1 – кінцева точка (евтаназія), а 5 - це здоровий стан з невеликими ознаками або без ознак початку хвороби. Тварин оцінювали в балах, акуратно піднімаючи їх за основу хвоста й реєструючи наявність тремору, скутості та їх здатність витягати кінцівки.

Система підрахунку балів:

- 5 = здорова тварина

- 4–5 = загалом здорова, мінімальний тремор, дуже активна тварина, витягування всіх кінцівок

- 4 = видимий мінімальний тремор, витягування всіх кінцівок, дуже активна тварина

- 3–4 = тремор, деяка мінімальна скутість, дуже активна тварина

- 3 = тремор, скутість кінцівок, може бути мінімальний параліч, активна тварина

- 2–3 = тремор, частковий параліч, скутість, ускладнене витягування кінцівок, активна тварина

- 2 = параліч, до деякої міри активна тварина

- 1–2 = параліч задніх кінцівок, відсутнє витягування кінцівок, евтаназія може бути здійснена залежно від активності тварини і її здатності звестися протягом 30 с

- 1 = кінцева точка, тварина не здатна звестися.

Початок хвороби реєстрували, коли кількість балів досягала стадії хвороби 4.

Тестування поведінки

Усі поведінкові тести припиняли у віці 20 тижнів, коли приблизно 70 % мишей у групі із введенням розріджувача TG померли. Інші миші після досягнення цього віку занадто слабкі для проведення рухового тестування, тому в цих мишей визначали тільки вагу тіла, стадію хвороби й вели підрахунок балів виживання.

Тест "відкрите поле"

Тест "відкрите поле" проводили до початку дозування (вихідний рівень) і приблизно на 90 день (у віці 13 тижнів) і 110 день (у віці 16 тижнів). Мишей, які народилися в межах 2-4 днів, об'єднували для проведення тесту "відкрите поле". Камери для реєстрації активності (Med Associates Inc, St Albans, VT; 27 × 27 × 20,3 див) були постачені ІЧ-променями. Мишей поміщали в центр камери й реєстрували їхню поведінку протягом 10 хвилин. Реєстрували дистанцію переміщення, кількість вертикальних стійок на задні лапи й швидкість пересування.

Тест "обертовий стрижень"

Тест "обертовий стрижень" проводили до початку дозування (вихідний рівень) і приблизно

на 90 день (у віці 13 тижнів) і 110 день (у віці 16 тижнів). Мишей, що народилися в межах 2-4 днів, об'єднували для проведення тесту "відкрите поле". Одноденна сесія включала "навчальну пробу" протягом 5 хвилин при 4 RPM на стрижні (Accuscan Instruments, Columbus, США). Через годину тварин тестували в 3 пробах, які проводили одну за одною, із прискоренням протягом 6 хвилин зі зміною швидкості від 0 до 40 RPM протягом 360 секунд і інтервалами між випробуваннями, щонайменше, 30 хвилин. Реєстрували затримку до падіння зі стрижня. Мишей, яким вдалося утриматися на стрижні довше 360 секунд, забирали, а їх час зараховували як 360 секунд.

Результати

Комбінована терапія є ефективною на моделі ALS in vivo.

Спостерігається поліпшення стану у хворих тварин, яких лікували лікарськими комбінаціями запропонованими винаходом. А саме, лікарські комбінації запропоновані винаходом ефективно поліпшують клінічний показник цих тварин протягом різних стадій хвороби (таблиця 5), а також виконання наведених вище поведінкових тестів (таблиця 6).

Таблиця 5

Лікарська комбінація	Поліпшення загального клінічного показника
баклофен і цинакальцет	+
цинакальцет і акампросат	+
баклофен-торасемід	+
баклофен-акампросат-торасемід	+
мексилетин і цинакальцет	+
сульфізоксазол і торасемід	+
баклофен і акампросат	+

Таблиця 6

Лікарська комбінація	Поведінкове тестування Поліпшення виконання	
	Тест із використанням Ротарода	Тест "відкрите поле»
баклофен і цинакальцет	+	+
цинакальцет і акампросат	+	+
баклофен-торасемід	+	+
баклофен-акампросат-торасемід	+	+
мексилетин і цинакальцет	+	+
сульфізоксазол і торасемід	+	+
баклофен і акампросат	+	+

Композиції запропоновані винаходом також ефективно поліпшують загальний клінічний показник і перебіг хвороби у тварин, яких лікували рилузолем (таблиця 7).

Таблиця 7

Лікарська комбінація	Поліпшення загального клінічного показника у тварин, яких лікували рилузолем
баклофен і цинакальцет	+
цинакальцет і акампросат	+
баклофен-торасемід	+
баклофен-акампросат-торасемід	+
мексилетин і цинакальцет	+
сульфізоксазол і торасемід	+
баклофен і акампросат	+

Посилання

1. Camu W, Khoris J, Moulard B, Salachas F, Briolotti V, Rouleau GA, Meininger V, Genetics of familial ALS and consequences for diagnosis. French ALS Research Group. J Neurol Sci. 1999; 165 Suppl 1(S21-26)

2. Mitchell JD, Borasio GD, Amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 2007; 369(9578):2031-41.

3. Phukan J, Pender NP, Hardiman O, Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 2007; 6(11):994-1003.
4. Hammad M, Silva A, Glass J, Sladky JT, Benatar M, Clinical, electrophysiologic, and pathologic evidence for sensory abnormalities in ALS. *Neurology.* 2007; 69(24):2236-42.
- 5 5. Yoshida S, Kihira T, Yase Y, Etiology of Kii ALS/PDC, featuring a mineral hypothesis. *Rinsho Shinkeigaku.* 2007; 47(11):970-3.
6. Waring SC, Esteban-Santillan C, Reed DM, Craig UK, Labarthe DR, Petersen RC, Kurland LT, Incidence of amyotrophic lateral sclerosis and of the parkinsonism-dementia complex of Guam, 1950-1989. *Neuroepidemiology.* 2004; 23(4):192-200.
- 10 7. Sapp PC, Rosen DR, Hosler BA, Esteban J, McKenna-Yasek D, O'regan JP, Horvitz HR, Brown RH Jr, Identification of three novel mutations in the gene for Cu/Zn superoxide dismutase in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul Disord.* 1995; 5(5):353-7.
8. Hentati A, Ouahchi K, Pericak-Vance MA, Nijhawani D, Ahmad A, Yang Y, Rimmler J, Hung W, Schlotter B, Ahmed A, Ben Hamida M, Hentati F, Siddique T, Linkage of a commoner form of recessive amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 15q15-q22 markers. *Neurogenetics.* 1998; 2(1):55-60.
- 15 9. Ruddy DM, Parton MJ, Al-Chalabi A, Lewis CM, Vance C, Smith BN, Leigh PN, Powell JF, Siddique T, Meyjes EP, Baas F, de Jong V, Shaw CE, Two families with familial amyotrophic lateral sclerosis are linked to a novel locus on chromosome 16q. *Am J Hum Genet.* 2003; 73(2):390-6.
- 20 10. Pasinelli P, Brown RH, Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7(9):710-23.
11. Gurney ME, Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 1994; 331(25):1721-2.
12. Deng HX, Shi Y, Furukawa Y, Zhai H, Fu R, Liu E, Gorrie GH, Khan MS, Hung WY, Bigio EH, Lukas T, Dal Canto MC, O'halloran TV, Siddique T, Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(18):7142-7.
- 25 13. Cai H, Lin X, Xie C, Laird FM, Lai C, Wen H, Chiang HC, Shim H, Farah MH, Hoke A, Price DL, Wong PC, Loss of ALS2 function is insufficient to trigger motor neuron degeneration in knock-out mice but predisposes neurons to oxidative stress. *J Neurosci.* 2005; 25(33):7567-74.
14. Comi GP, Bordoni A, Salani S, Franceschina L, Sciacco M, Prella A, Fortunato F, Zeviani M, Napoli L, Bresolin N, Moggio M, Ausenda CD, Taanman JW, Scarlato G, Cytochrome c oxidase subunit I microdeletion in a patient with motor neuron disease. *Ann Neurol.* 1998; 43(1):110-6.
15. Borthwick GM, Taylor RW, Walls TJ, Tonska K, Taylor GA, Shaw PJ, Ince PG, Turnbull DM, Motor neuron disease in a patient with a mitochondrial trnaile mutation. *Ann Neurol.* 2006; 59(3):570-4.
- 35 16. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P, VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet.* 2003; 34(4):383-94.
17. Bigio EH, Lipton AM, White CL 3rd, Dickson DW, Hirano A. Frontotemporal and motor neurone degeneration with neurofilament inclusion bodies: additional evidence for overlap between FTD and ALS. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2003 Jun;29(3):239-53.
- 45 18. Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 1996;347:1425-1431.
19. Ettmayer P, Amidon GL, Clement B, Testa B, Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J Med Chem.* 2004. 47(10): p. 2393-404.
- 50 20. 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.* 2003. 4(6): p. 461-85.
21. Yang CY, Dantzig AH, and Pidgeon C, Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm Res.* 1999. 16(9): p. 1331-43.
- 55 22. Steffansen, B., Nielsen CU, Brodin B, Eriksson AH, Andersen R, Frokjaer S, Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur J Pharm Sci.* 2004. 21(1): p. 3-16.
23. Heimbach T, Oh DM, Li LY, Rodríguez-Hornedo N, Garcia G, Fleisher D, Enzyme-mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs. *Int J Pharm.* 2003. 261(1-2): p. 81-92.
- 60

24. Stella, BORCHARDT R, HAGEMAN M, OLIYAI R, MAAG H, TILLEY J, Prodrugs: Challenges and Rewards. Vol. Vol. 1-2. 2007, New York: AAPS Press and Springer.

25. Wermuth CG, Designing prodrugs and bioprecursors, in The Practice of Medicinal Chemistry, Hardbound, Editor. 2003.

5 26. Pezron I, Mitra AK, Duvvuri S, Tirucherai GS, Prodrug strategies in nasal drug delivery. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2002. 12(3): pp. 331-340(10).

27. Stella, V.J., Prodrugs as therapeutics Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2004. 14(3): p. pp. 277-280(4).

10 28. Higuchi T, Stella VJ, Prodrugs As Novel Drug Delivery Systems. ACS Symposium Series., ed. A.C. Society. 1975, Washington, DC.

29. Roche EB, Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs. 1977, Washington, DC American Pharmaceutical Association.

30. Stella VJ, Nti-Addae KW, Prodrugs strategies to overcome poor water solubility. Adv Drug Deliv Rev, 2007. 59(7): p. 677-94.

15 31. Lal R, Sukbuntherng J, Tai EH, Upadhyay S, Yao F, Warren MS, Luo W, Bu L, Nguyen S, Zamora J, Peng G, Dias T, Bao Y, Ludwikow M, Phan T, Scheuerman RA, Yan H, Gao M, Wu QQ, Annamalai T, Raillard SP, Koller K, Gallop MA, Cundy KC, 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.

20 32. Xu F, Peng G, Phan T, Dilip U, Chen JL, Chernov-Rogan T, Zhang X, Grindstaff K, Annamalai T, Koller K, Gallop MA, Wustrow DJ, Discovery of a novel potent GABA(B) receptor agonist. Bioorg Med Chem Lett, 2011. 21(21): p. 6582-5.

25 33. 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):569-76.

34. Leach AR, Gillet VJ, An Introduction to Chemoinformatics. 2007: Springer.

35. Rahman SA, Bashton M, Holliday GL, Schrader R, Thornton JM, Small Molecule Subgraph Detector (SMSD) toolkit. J Cheminform, 2009. 1(1): p. 12.

30 36. 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, 2008. 36(Database issue): p. D901-6.

37. Stahl, H. and C.G. Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use. 2 ed. 2011: Wiley-vch.

35 38. Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, and Dorsa Dmmitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. J. Neuroscience, 1999. 19(7):2455-2463.

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

40 40. Gurney M, Pu H, Chiu A, Dal Canto M, Polchow C, Alexander D, Caliendo J, Hentati A, Kwon Y, Deng H, Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. Science. 1994 Jun 17;264(5166):1772-5.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

45

1. Застосування композиції, яка містить акампросат та баклофен або їх солі для виробництва медикаменту для лікування ALS або захворювання рухових нейронів, вибраного з первинного латерального склерозу (PLS), прогресуючої м'язової атрофії (PMA), псевдобульбарного синдрому і прогресуючого бульбарного синдрому (PBP), а також лобово-скроневої деменції (FTD).

50

2. Застосування за п. 1, яке **відрізняється** тим, що композиція містить щонайменше одну з наступних лікарських комбінацій:

- баклофен і акампросат,

- баклофен і акампросат, і торасемід або їх сіль.

55

3. Застосування за п. 1 або 2, яке **відрізняється** тим, що композиція містить додатково рилузол або його сіль.

4. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що композиція додатково містить фармацевтично прийнятний носій або ексципієнт.

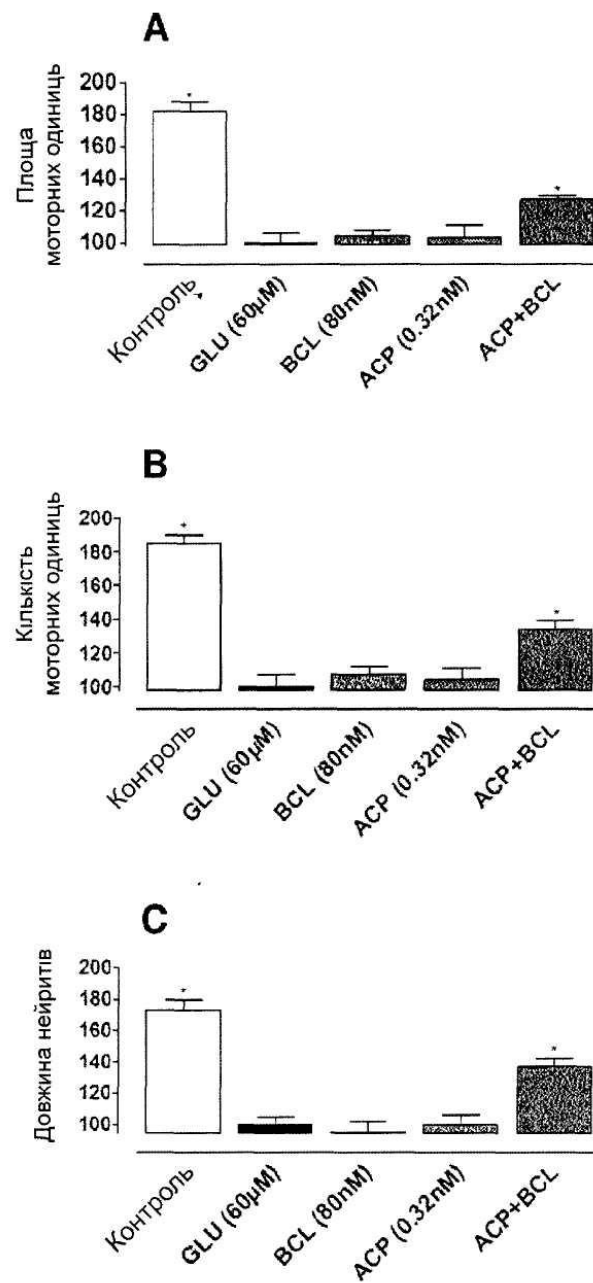
60

5. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що в композиції сполуки уведені до складу або вводяться разом, окремо або послідовно.

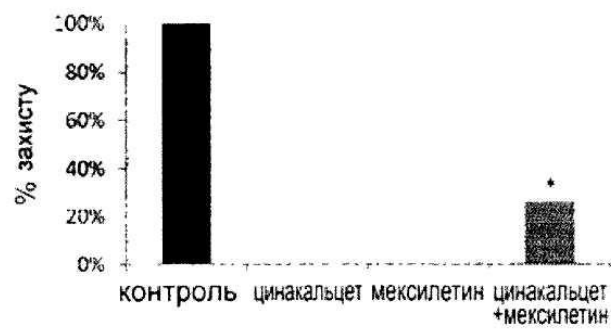
6. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що зазначена композиція вводиться суб'єктові багаторазово.
7. Застосування за будь-яким з пунктів 3-6, яке **відрізняється** тим, що рилузол уводиться в дозуванні від 0,01 до 50 мг на день.
- 5 8. Застосування за будь-яким з пунктів 1-7, яке **відрізняється** тим, що акампросат уводиться в дозуванні менше ніж 50 мг на день, більш переважно, менше ніж 10 мг на день.
9. Застосування за будь-яким з пунктів 1-8, яке **відрізняється** тим, що баклофен уводиться в дозуванні менше ніж 30 мг на день.
- 10 10. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що зазначена композиція вводиться перорально.
11. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що зазначена композиція вводиться перорально й багаторазово через день почергово з рилузолом.
12. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що сполуки включаються до складу разом.
- 15 13. Застосування акампросату або його солі в комбінації з баклофеном, або сіллю, для лікування ALS або захворювання рухових нейронів, вибраного з первинного латерального склерозу (PLS), прогресуючої м'язової атрофії (PMA), псевдобульбарного синдрому і прогресуючого бульбарного синдрому (PBP), а також лобово-скроневої деменції (FTD).
- 20 14. Застосування акампросату або його солі в комбінації з баклофеном і рилузолом, або їх сіллю, для лікування ALS або захворювання рухових нейронів, вибраного з первинного латерального склерозу (PLS), прогресуючої м'язової атрофії (PMA), псевдобульбарного синдрому і прогресуючого бульбарного синдрому (PBP), а також лобово-скроневої деменції (FTD).



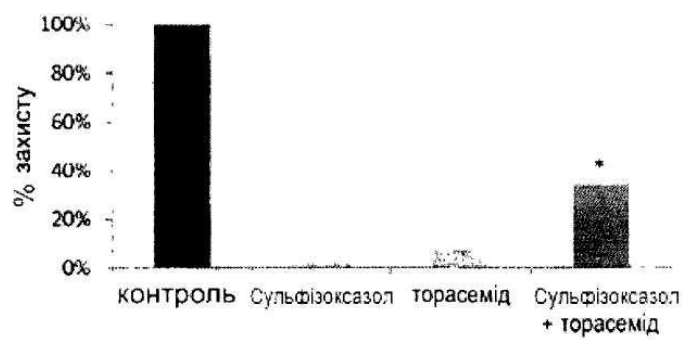
Фіг. 1



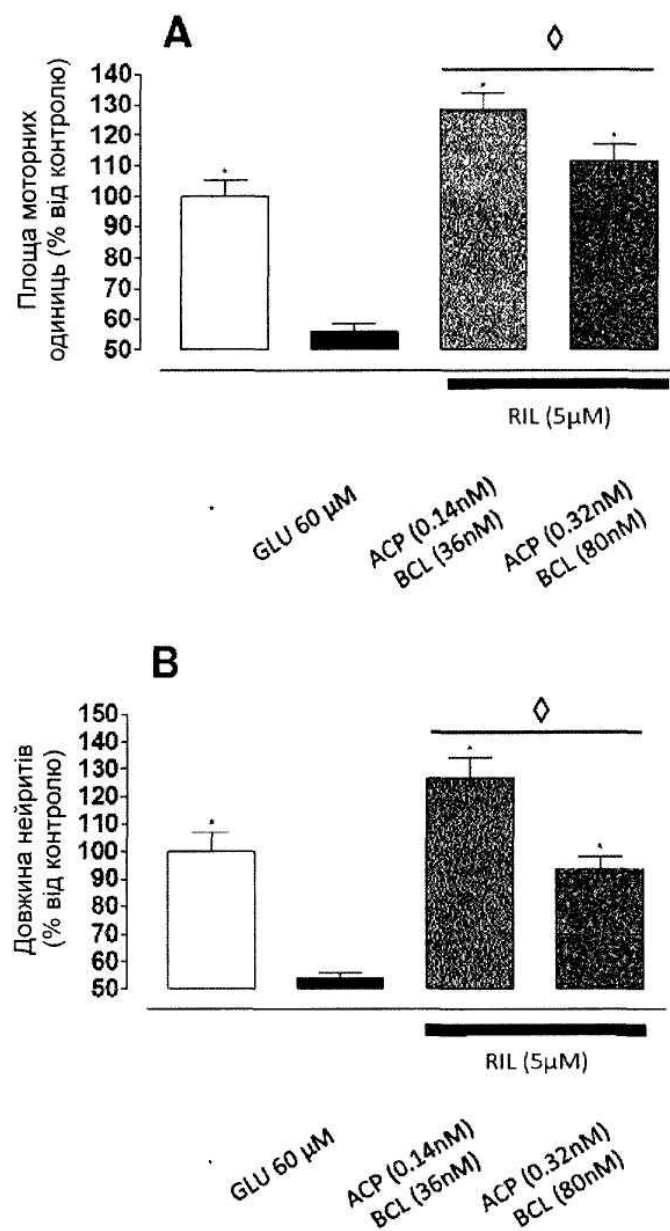
Фіг. 2



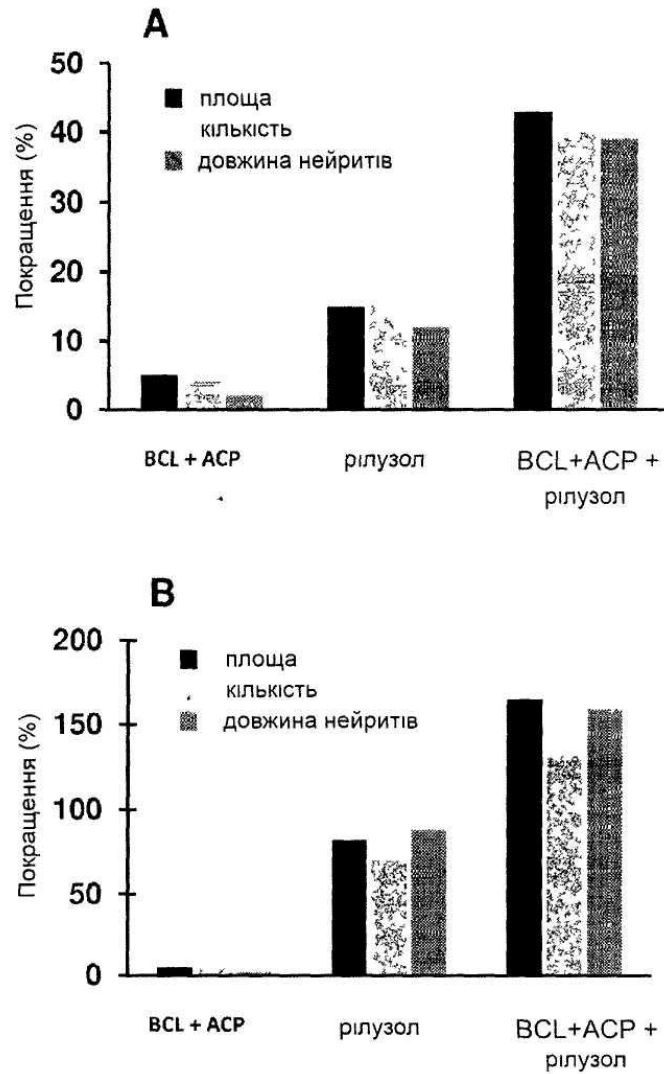
Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6

Комп'ютерна верстка В. Мацело

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

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