



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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.07.20**

**(21)** Номер заявки  
**202190151**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.07.01**

**(51)** Int. Cl. *A61K 45/06* (2006.01)  
*A61K 31/13* (2006.01)  
*A61K 31/155* (2006.01)  
*A61K 31/445* (2006.01)  
*A61K 31/55* (2006.01)  
*A61K 31/27* (2006.01)  
*A61P 3/00* (2006.01)  
*A61P 21/00* (2006.01)

**(54) ПРИМЕНЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМБИНАЦИИ ПРИ ВОЗРАСТНЫХ И/ИЛИ ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ И ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ И/ИЛИ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ С СОХРАНЕНИЕМ ЗДОРОВЬЯ**

**(31)** **18180906.2**

**(32)** **2018.06.29**

**(33)** **EP**

**(43)** **2021.04.16**

**(86)** **PCT/EP2019/067645**

**(87)** **WO 2020/002715 2020.01.02**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**РИДЖУВЭНЕЙТ БАЙОМЕД (BE)**

**(72)** Изобретатель:  
**Бельэн Энн (BE)**

**(74)** Представитель:  
**Носырева Е.Л. (RU)**

**(56)** WO-A1-2009039313  
CN-B-104623671  
CN-A-103860532

BARZILAI NIR ET AL.: "Metformin as a Tool to Target Aging", CELL METABOLISM, CELL PRESS, UNITED STATES, vol. 23, № 6, 14 June 2016 (2016-06-14), p. 1060-1065, XP029601864, ISSN: 1550-4131, DOI: 10.1016/j.cmet.2016.05.011, the whole document

CHEN JIE ET AL.: "Metformin extends C elegans lifespan through lysosomal pathway", ELIFE, vol. 6, 13 October 2017 (2017-10-13), XP002787206, abstract

FILIPE CABREIRO ET AL.: "Metformin Retards Aging in C elegans by Altering Microbial Folate and Methionine Metabolism", CELL, vol. 153, № 1, 1 March 2013 (2013-03-01), p. 228-239, XP055531462, AMSTERDAM, NL, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.035, abstract

WO-A1-2012012156

PATRIZIA PASANISI ET AL.: "A randomized controlled trial of Mediterranean diet and metformin to prevent age-related diseases in people with metabolic syndrome", TUMORI, vol. 104, № 2, 8 March 2018 (2018-03-08), p. 137-142, XP055529738, IT, ISSN: 0300-8916, DOI: 10.5301/tj.5000599, abstract

HYE YEON SIN ET AL.: "Total cholesterol, high density lipoprotein and triglyceride for cardiovascular disease in elderly patients treated with metformin", ARCHIVES OF PHARMACAL RESEARCH, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF KOREA, HEIDELBERG, vol. 34, № 1, 6 April 2011 (2011-04-06), p. 99-107, XP019893772, ISSN: 1976-3786, DOI: 10.1007/S12272-011-0112-5, abstract

C.J. GLUECK ET AL.: "Metformin reduces weight, centripetal obesity, insulin, leptin, and low-density lipoprotein cholesterol in nondiabetic, morbidly obese subjects with body mass index greater than 30", METABOLISM, vol. 50, № 7, 1 July 2001 (2001-07-01), p. 856-861, XP055032336, ISSN: 0026-0495, DOI: 10.1053/meta.2001.24192, abstract

GEETIKA GARG ET AL.: "Antiaging Effect of Metformin on Brain in Naturally Aged and Accelerated Senescence Model of Rat", REJUVENATION RESEARCH, vol. 20, № 3, 1 June 2017 (2017-06-01), p. 173-182, XP055529841, US, ISSN: 1549-1684, DOI: 10.1089/rej.2016.1883, abstract

Zarra ET AL.: "Efficacy and safety of galantamine in long-term treatment for mild cognitive impairment", Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association, 1 January 2012 (2012-01-01), p. P586-P586, XP55528716, DOI: 10.1016/j.jalz.2012.05.1596, retrieved from the Internet: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924977X11709063/pdf?md5=4f69e8c045607a471a485e69b3fa2e81&pid=1-s2.0-S0924977X11709063-main.pdf>, abstract

**(57)** Изобретение относится к применению фармацевтической комбинации для лечения, предупреждения и/или уменьшения симптомов возрастных заболеваний и/или дегенеративных заболеваний. В частности, указанная фармацевтическая комбинация содержит метморфин и галантамин. Изобретение дополнительно также направлено на применение указанной фармацевтической комбинации для предупреждения, стабилизации и/или уменьшения количества жалоб, связанных с возрастными заболеваниями, и/или жалоб, связанных с дегенеративными заболеваниями, а также для улучшения показателя продолжительности жизни и/или продолжительности жизни с сохранением здоровья.

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к применению фармацевтической комбинации для лечения, предупреждения и/или уменьшения симптомов возрастных заболеваний и/или дегенеративных заболеваний. В частности, указанная фармацевтическая комбинация содержит метморфин и галантамин. Настоящее изобретение также направлено на применение указанной фармацевтической комбинации для предупреждения, стабилизации и/или уменьшения количества жалоб, связанных с возрастными заболеваниями, и/или жалоб, связанных с дегенеративными заболеваниями, а также для улучшения показателя продолжительности жизни и/или продолжительности жизни с сохранением здоровья.

### Уровень техники

Старение представляет собой постепенную потерю функции и ухудшение состояния на клеточном, тканевом и органном уровне, ведущие к прогрессирующей потере физиологической целостности, повышенной восприимчивости к заболеваниям и внешним стрессорам и в конечном итоге к смерти. По мере того как старение населения Земли повышается, с каждым годом увеличивается процент пациентов с возрастными заболеваниями. И, следовательно, были предприняты многочисленные попытки лечения возрастных заболеваний, а также попытки отсрочить начало сложного процесса старения. В результате был идентифицирован ряд связанных с возрастными заболеваниями путей, на которые можно целенаправленно воздействовать с увеличением продолжительности жизни и продолжительности жизни с сохранением здоровья. Например, существуют неопровержимые доказательства того, что мутации отдельных генов в путях распознавания питательных веществ, таких как передача сигналов с участием инсулина/инсулиноподобного фактора роста (IGF), или механистическое нацеливание на сигнальные пути с участием рапамицина (mTOR) увеличивают продолжительность жизни и продолжительность жизни с сохранением здоровья беспозвоночных. Данные пути также были оценены в моделях млекопитающих, в которых продолжительность жизни с сохранением здоровья и продолжительность жизни были увеличены с помощью генетической манипуляции или лекарственных средств. Несмотря на то что это вселяет надежду на новые вмешательства, в том числе лекарственные средства, которые замедляют процесс старения и замедляют появление возрастных заболеваний, модулируя консервативные пути старения, к настоящему времени за исключением некоторого симптоматического лечения, к сожалению, отсутствует известное вмешательство, которое, как было показано, является эффективным в замедлении процесса старения человека. В конце концов, помимо лечения существующих заболеваний и нарушений медикаментами, растет необходимость и потребность в мерах по поддержанию здоровья и замедлению старения.

За последние десятилетия для лучшего понимания сложных процессов старения с помощью научных экспериментов применяли несколько модельных организмов. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) представляет собой модельный животный организм, широко применяемый для изучения старения и возрастных заболеваний, который имеет важные преимущества, такие как короткий жизненный цикл, простота осуществления экспериментальных процедур и богатые генетические ресурсы. Кроме того, он представляет собой первый многоклеточный организм, полное секвенирование генома которого было завершено, геном которого состоит из 2/3 генов, связанных с заболеваниями человека, а в трансгенной модели заболевания можно легко блокировать с помощью GFP-мечения и технологии полногеномной RNAi, а также можно проводить систематические и полные последующие пожизненные исследования в отношении дегенеративной патологии и потенциальных лекарственных средств на индивидуальном уровне, что особенно важно для изучения старения и возрастных заболеваний. Таким образом, использование *C. elegans* в значительной степени способствует объяснению возрастных патологических механизмов и разработке активных соединений.

Метформин широко применяется и одобрен в качестве антидиабетического препарата для лечения диабета 2 типа. Он повышает чувствительность к инсулину и тем самым улучшает действие инсулина на клеточном уровне, при этом не влияя на секрецию инсулина. Также было показано, что метформин оказывает положительное влияние на несколько факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме того, было показано, что метформин также целенаправленно воздействует на ряд механизмов старения. В частности, касательно старения метформин приводит к снижению уровню инсулина, сниженной передаче сигналов с участием IGF-1, ингибированию mTOR, ингибированию митохондриального комплекса I в цепи переноса электронов и снижению продуцирования эндогенных активных форм кислорода, активации АМР-активируемой киназы (АМРК) и снижению уровня повреждения ДНК. Также было показано, что метформин благоприятно влияет на метаболические и клеточные процессы, тесно связанные с развитием возрастных состояний, таких как воспаление, аутофагия и клеточное старение (Barzilai et al., *Cell Metab.*, 2016). С применением модельной системы *C. elegans*, также были подтверждены полезные для здоровья и способствующие продлению жизни эффекты метформина при диабете 2 типа.

Исследования с участием людей также показали, что метформин значительно снижает риск развития рака у пациентов с сахарным диабетом (Futing et al., *Oncol. Lett.*, 2018) и снижает риск ишемической болезни сердца (Hong et al., *Diabetes Care.*, 2014). Однако все эти эффекты наблюдались при введении метформина в очень высокой терапевтической дозе, которая составляет по меньшей мере 1500 мг/сутки или больше. Кроме того, до сих пор не было выявлено синергетических эффектов метформина в комби-

нации с другим соединением в отношении возрастных заболеваний.

Галантамин, ингибитор ацетилхолинэстеразы, который аллостерически модулирует никотиновые рецепторы, широко известен как препарат, назначаемый пациентам с болезнью Альцгеймера. Было показано, что у *C. elegans* галантамин способствует холинергической нейротрансмиссии таким же образом, как и у людей, и устраняет фенотип паралича на трансгенной модели болезни Альцгеймера у *C. elegans* (Xin et al., Plos One, 2013), однако эффекты галантамина в отношении двигательной активности, подвижности или других форм возрастного увядания у *C. elegans* описаны не были. Было показано, что у людей галантамин значительно снижает смертность от инфаркта миокарда (Nordstrom et al., 2013). Кроме того, галантамин уменьшает воспаление и резистентность к инсулину у субъектов с метаболическим синдромом (Consolim-Colombo et al.; JCI Insight., 2017). Однако все эти эффекты наблюдались при введении галантамина в очень высокой терапевтической дозе, которая составляет по меньшей мере 24 мг/сутки или больше. Кроме того, также для галантамина не было выявлено синергических эффектов в отношении возрастных заболеваний, в случае комбинации галантамина с другим соединением.

В настоящем изобретении авторы настоящего изобретения идентифицировали потенцирующий и даже синергический эффект в отношении возрастных заболеваний с использованием бигуанида метформина в комбинации с ингибитором ацетилхолинэстеразы галантамином. В частности, данный эффект наблюдался даже при введении по меньшей мере одного из соединений или обоих соединений в их терапевтической дозе.

### **Краткое описание изобретения**

В настоящем изобретении предусмотрено применение фармацевтической комбинации, содержащей метморфин и галантамин, для лечения, предупреждения и/или уменьшения симптомов возрастных и/или дегенеративных заболеваний. Кроме того, также раскрыто применение указанной фармацевтической комбинации для предупреждения, стабилизации и/или уменьшения количества жалоб, связанных с возрастными заболеваниями, и/или жалоб, связанных с дегенеративными заболеваниями, и применение указанной фармацевтической комбинации для улучшения показателя продолжительности жизни и/или продолжительности жизни с сохранением здоровья.

Фармацевтическая комбинация в соответствии со всеми различными вариантами осуществления настоящего изобретения содержит метморфин и галантамин. В первой цели настоящего изобретения фармацевтическая комбинация во всех ее различных вариантах осуществления, кратко описанная в данном документе выше, предназначена для применения в лечении, предупреждении, стабилизации и/или уменьшении симптомов возрастных и/или дегенеративных заболеваний у субъекта.

В другом варианте осуществления указанные возрастные и/или дегенеративные заболевания выбраны из группы, включающей иммунные заболевания, воспалительные заболевания, метаболические заболевания, заболевания системы кровообращения, артропатии, заболевания пищеварительной системы, ассоциированные с митохондриями заболевания, заболевания нервно-скелетно-мышечной системы, саркопению и дряблость.

В дополнительном и более предпочтительном аспекте возрастные и/или дегенеративные заболевания выбраны из группы, включающей возрастные и/или дегенеративные заболевания нервно-скелетно-мышечной системы, дряблость, воспалительные заболевания и/или метаболические нарушения. В еще одном варианте осуществления фармацевтическая комбинация в соответствии со всеми ее вариантами осуществления предназначена для применения в лечении, предупреждении, стабилизации, задержке начала проявления и/или уменьшении симптомов возрастных и/или дегенеративных заболеваний, выбранных из заболеваний нервно-скелетно-мышечной системы и/или дряблости. В контексте настоящего изобретения возрастные и/или дегенеративные заболевания нервно-скелетно-мышечной системы выбраны из экстрапирамидных и двигательных нарушений, заболеваний нервно-мышечного соединения и мышц, типов системной атрофии, поражающих в первую очередь центральную нервную систему, мышечной дистрофии, мышечной дистрофии Дюшенна, спинальной мышечной атрофии и сопутствующих заболеваний, заболеваний двигательных нейронов, таких как амиотрофический латеральный склероз, аномальных произвольных движений, аномалий походки и подвижности, атаксии, ассоциированных с митохондриями нервно-скелетно-мышечных заболеваний и саркопении.

Таким образом, в конкретном аспекте фармацевтическая комбинация в соответствии со всеми ее вариантами осуществления предназначена для применения в лечении, предупреждении, стабилизации и/или уменьшении симптомов дряблости.

В другом конкретном аспекте фармацевтическая комбинация в соответствии со всеми ее вариантами осуществления предназначена для применения в лечении, предупреждении, стабилизации и/или уменьшении симптомов саркопении.

В еще одном конкретном аспекте фармацевтическая комбинация в соответствии со всеми ее вариантами осуществления предназначена для применения в лечении, предупреждении, стабилизации и/или уменьшении симптомов экстрапирамидных и двигательных нарушений, заболеваний нервно-мышечного соединения и мышц, типов системной атрофии, в первую очередь поражающих центральную нервную систему, мышечной дистрофии, мышечной дистрофии Дюшенна, спинальной мышечной атрофии и сопутствующих заболеваний, заболеваний двигательных нейронов, таких как амиотрофический латераль-

ный склероз, аномальных произвольных движений, аномалий походки и подвижности или атаксии.

Как уже кратко описано выше и в конкретном варианте осуществления, фармацевтическая комбинация в соответствии со всеми ее вариантами осуществления предназначена для применения в лечении, предупреждении, стабилизации и/или уменьшении симптомов ассоциированных с митохондриями нервно-скелетно-мышечных заболеваний. Указанные ассоциированные с митохондриями нервно-скелетно-мышечные заболевания выбраны из заболеваний центрального стержня и ассоциированных с атрофией зрительного нерва I типа заболеваний (OPA1). Указанные ассоциированные с OPA1 заболевания выбраны из атрофии зрительного нерва, ассоциированной с OPA1 гипертензии и ассоциированной с OPA1 атрофии.

В другом аспекте фармацевтическая комбинация в соответствии со всеми ее различными вариантами осуществления предназначена для применения в лечении, предупреждении, стабилизации и/или уменьшении симптомов возрастных и/или дегенеративных воспалительных заболеваний, в частности воспалительных заболеваний, ассоциированных с повышенными уровнями цитокинов.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая комбинация в соответствии со всеми ее различными вариантами осуществления предназначена для применения в лечении, предупреждении, стабилизации и/или уменьшении симптомов возрастных и/или дегенеративных эндокринных и метаболических нарушений. В дополнительном варианте осуществления указанные возрастные и/или дегенеративные эндокринные и метаболические нарушения выбраны из ожирения, гипертензии, метаболического синдрома, в частности саркопенического ожирения.

В другом аспекте фармацевтическая комбинация в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения в лечении, предупреждении, стабилизации и/или уменьшении симптомов возрастных иммунных заболеваний, таких как снижение иммунного ответа, связанное с возрастными заболеваниями (например, ответа на вакцинацию), или дисфункция, бактериальные инфекционные заболевания и вирусные инфекционные заболевания.

В другом аспекте фармацевтическая комбинация в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения в лечении, предупреждении, стабилизации и/или уменьшении симптомов возрастных эндокринных и метаболических заболеваний, таких как ожирение, саркопеническое ожирение, метаболический синдром, диабет II типа и прогерия.

В дополнительном аспекте фармацевтическая комбинация в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения в лечении, предупреждении, стабилизации и/или уменьшении симптомов возрастных заболеваний системы кровообращения, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, заболевания периферических артерий или инсульт.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая комбинация в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения в лечении, предупреждении, стабилизации и/или уменьшении симптомов возрастных артропатий, таких как ревматоидный артрит или остеоартрит.

В другом варианте осуществления фармацевтическая комбинация в соответствии с настоящими изобретением предназначена для применения в лечении, предупреждении, стабилизации и/или уменьшении симптомов возрастных заболеваний пищеварительной системы, таких как воспалительное заболевание печени, нарушения пищеварительного тракта или запор.

Как кратко описано выше, типичным для настоящего изобретения является то, что указанная фармацевтическая комбинация предназначена для применения в лечении, предупреждении, стабилизации и/или уменьшении симптомов возрастных и/или дегенеративных заболеваний в соответствии со всеми различными вариантами осуществления. В конкретном аспекте настоящего изобретения фармацевтическая комбинация в соответствии со всеми ее вариантами осуществления предназначена для применения в предупреждении указанных возрастных и/или дегенеративных заболеваний. В другом аспекте фармацевтическая комбинация в соответствии со всеми ее вариантами осуществления предназначена для применения в лечении возрастных и/или дегенеративных заболеваний. В еще одном дополнительном аспекте фармацевтическая комбинация в соответствии со всеми ее вариантами осуществления предназначена для применения в стабилизации возрастных и/или дегенеративных заболеваний в соответствии со всеми различными вариантами осуществления. В еще одном аспекте фармацевтическая комбинация в соответствии со всеми ее вариантами осуществления предназначена для применения в уменьшении симптомов возрастных и/или дегенеративных заболеваний в соответствии со всеми ее вариантами осуществления. В дополнительном аспекте указанные возрастные и/или дегенеративные заболевания выбраны из возрастных и/или дегенеративных заболеваний нервно-скелетно-мышечной системы, саркопении и/или дряблости.

Во второй цели в настоящем изобретении предусмотрено применение фармацевтической комбинации для предупреждения, стабилизации и/или уменьшения количества жалоб, связанных с возрастными заболеваниями, дегенеративной дисфункции и/или жалоб, связанных с дегенеративными заболеваниями. В конкретном аспекте в настоящем изобретении дополнительно предусмотрено применение фармацевтической комбинации для предупреждения, стабилизации и/или уменьшения количества жалоб, связанных с возрастными заболеваниями, дегенеративной дисфункции и/или жалоб, связанных с дегенеративными заболеваниями, которые выбраны из группы, включающей мышечную слабость, сниженную мы-

шечную силу, нервно-мышечную дегенерацию, сниженную подвижность и общую слабость. В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрено применение фармацевтической комбинации для предупреждения, стабилизации и/или уменьшения количества жалоб, связанных с возрастными заболеваниями, дегенеративной дисфункции и/или жалоб, связанных с дегенеративными заболеваниями, которые выбраны из группы, включающей мышечную слабость, сниженную мышечную силу, нервно-мышечную дегенерацию, сниженную подвижность. В другом конкретном аспекте и в контексте настоящего изобретения жалоба, связанная с возрастными заболеваниями, представляет собой общую слабость.

В третьей цели в настоящем изобретении предусмотрено применение фармацевтической комбинации для улучшения показателя продолжительности жизни и/или продолжительности жизни с сохранением здоровья. В дополнительном аспекте улучшенный показатель продолжительности жизни и/или продолжительности жизни с сохранением здоровья выбраны из группы, включающей улучшение функционирования при ограничении физических возможностей, связанном с возрастными заболеваниями, стабилизацию при прогрессировании ограничения физических возможностей, связанного с возрастными заболеваниями, ослабление или стабилизацию жалоб, связанных с возрастными заболеваниями, ослабление или стабилизацию дегенеративной дисфункции и жалоб, связанных с дегенеративными заболеваниями, относительно состояния субъекта до введения фармацевтической комбинации или относительно контрольной популяции.

Фармацевтическая комбинация в соответствии со всеми путями применения различных вариантов осуществления настоящего изобретения содержит метморфин и галантамин.

В контексте настоящего изобретения жалобы, связанные с возрастными заболеваниями, дегенеративная дисфункция и/или жалобы, связанные с дегенеративными заболеваниями, включают без ограничения мышечную слабость, сниженную мышечную силу, нервно-мышечную дегенерацию, сниженную подвижность, нарушенный иммунный ответ, нарушение метаболизма, общую слабость и дряблость. В конкретном аспекте и в контексте настоящего изобретения жалобы, связанные с возрастными заболеваниями, дегенеративная дисфункция и/или жалобы, связанные с дегенеративными заболеваниями, выбраны из мышечной слабости, сниженной мышечной силы, нервно-мышечной дегенерации, сниженной подвижности. В другом конкретном аспекте и в контексте настоящего изобретения жалоба, связанная с возрастными заболеваниями, представляет собой общую слабость.

В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение фармацевтической комбинации, кратко описанной выше, для предупреждения, стабилизации ухудшения и/или уменьшения дряблости, при этом уменьшение дряблости или стабилизация ухудшения дряблости выбраны из группы параметров, включающих увеличенную силу, стабилизацию потери силы, увеличение мышечной массы тела, стабилизацию потери веса, улучшение подвижности, стабилизацию снижения подвижности, увеличенный уровень энергии, стабилизацию потери энергии, повышенные уровни активности, стабилизацию потери активности, повышенную выносливость, стабилизацию потери выносливости, усиленную поведенческую реакцию на сенсорный сигнал, стабилизацию поведенческой реакции на сенсорный сигнал, снижение или стабилизацию уровня одного или более маркеров воспаления или биомаркеров, улучшение гомеостаза глюкозы и метаболического или катаболического состояния, улучшение нейротрансмиссии или нервно-мышечной передачи и уменьшение уровня одного или более биомаркеров активации свертывания крови, при этом снижение или стабилизация рассматриваются относительно состояния субъекта до введения фармацевтической комбинации или относительно контрольной популяции.

В другом дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая комбинация, кратко описанная выше, для применения в лечении, предупреждении, стабилизации ухудшения и/или уменьшении дряблости, при этом уменьшение дряблости или стабилизация ухудшения дряблости выбраны из группы параметров, включающих увеличенную силу, стабилизацию потери силы, увеличение мышечной массы тела, стабилизацию потери веса, улучшение подвижности, стабилизацию снижения подвижности, увеличенный уровень энергии, стабилизацию потери энергии, повышенные уровни активности, стабилизацию потери активности, повышенную выносливость, стабилизацию потери выносливости, усиленную поведенческую реакцию на сенсорный сигнал, стабилизацию поведенческой реакции на сенсорный сигнал, снижение или стабилизацию уровня одного или более маркеров воспаления или биомаркеров, улучшение гомеостаза глюкозы и метаболического или катаболического состояния, улучшение нейротрансмиссии или нервно-мышечной передачи и уменьшение уровня одного или более биомаркеров активации свертывания крови, при этом снижение или стабилизация рассматриваются относительно состояния субъекта до введения фармацевтической комбинации или относительно контрольной популяции.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение фармацевтической комбинации, кратко описанной выше, для улучшения показателя продолжительности жизни и/или продолжительности жизни с сохранением здоровья, при этом улучшенный показатель продолжительности жизни и/или продолжительности жизни с сохранением здоровья выбраны из группы, включающей улучшение функционирования при ограничении физических возможностей, связанном с возрастными заболеваниями, стабилизацию при прогрессировании ограничения физических возможностей, связанного с возрастными заболеваниями, ослабление или стабилизацию жалоб, связанных с возрастными

ми заболеваниями, ослабление или стабилизацию дегенеративной дисфункции и жалоб, связанных с дегенеративными заболеваниями, относительно состояния субъекта до введения фармацевтической комбинации или относительно контрольной популяции.

В другом варианте осуществления улучшенный показатель продолжительности жизни и/или продолжительности жизни с сохранением здоровья в контексте настоящего изобретения включает улучшение одного или более параметров, выбранных из группы, состоящей из уровня холестерина, уровня триглицеридов, уровня липопротеинов высокой плотности, уровня липопротеинов низкой плотности, уровень лептина, уровня адипонектина, параметров воспаления, параметров хронологического возраста относительно биологического возраста, а также артериального давления, старения иммунной системы, при этом указанный показатель продолжительности жизни и/или жизни с сохранением здоровья улучшается относительно состоянию субъекта до введения фармацевтической комбинации или относительно контрольной популяции.

В еще одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение фармацевтической комбинации, раскрытой выше, для улучшения показателя продолжительности жизни и/или продолжительности жизни с сохранением здоровья, в частности для повышения способности поддерживать гомеостаз во время воздействия стрессора и/или сокращения времени, необходимого для возврата к гомеостазу после воздействия стрессора.

Во всех различных вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическую комбинацию в соответствии с настоящим изобретением можно вводить субъекту, в частности субъекту-человеку, в терапевтической или субтерапевтической суточной дозе. В еще одном варианте осуществления по меньшей мере один из компонентов фармацевтической комбинации по настоящему изобретению вводится субъекту в субтерапевтической дозе. В другом варианте осуществления по меньшей мере один из компонентов фармацевтической комбинации в соответствии с настоящим изобретением вводится в терапевтической дозе. В еще одном варианте осуществления один из компонентов фармацевтической комбинации вводится в субтерапевтической дозе, тогда как другой компонент вводится в терапевтической дозе. В другом варианте осуществления все компоненты фармацевтической комбинации по настоящему изобретению вводятся субъекту в субтерапевтической дозе.

В предпочтительном варианте осуществления в фармацевтической комбинации метморфин вводится в субтерапевтической дозе, предпочтительно в субтерапевтической суточной дозе, составляющей максимум приблизительно 1500 мг/сутки на субъекта; более предпочтительно в субтерапевтической суточной дозе, которая составляет приблизительно 5 мг/сутки на субъекта или больше и максимум приблизительно 1500 мг/сутки на субъекта; даже более предпочтительно в субтерапевтической суточной дозе от приблизительно 5 мг/сутки до приблизительно 1000 мг/сутки на субъекта, даже более предпочтительно в субтерапевтической суточной дозе от приблизительно 5 мг/сутки до приблизительно 850 мг/сутки на субъекта, или от приблизительно 5 мг/сутки до приблизительно 800 мг/сутки на субъекта, или от приблизительно 5 мг/сутки до приблизительно 750 мг/сутки на субъекта, или от приблизительно 5 мг/сутки до приблизительно 700 мг/сутки на субъекта, или от приблизительно 5 мг/сутки на субъекта до приблизительно 500 мг/сутки на субъекта.

В другом варианте осуществления в фармацевтической комбинации метморфин также можно вводить в терапевтической дозе, предпочтительно в терапевтической суточной дозе, составляющей более 1500 мг/сутки на субъекта; даже более предпочтительно в терапевтической суточной дозе, которая составляет более 1500 мг/сутки и менее 3000 мг/сутки на субъекта.

В другом предпочтительном варианте осуществления в фармацевтической комбинации галантамин вводится в субтерапевтической дозе, предпочтительно в субтерапевтической суточной дозе, составляющей менее приблизительно 16 мг/сутки на субъекта; даже более предпочтительно в субтерапевтической дозе, которая составляет более приблизительно 0,08 мг/сутки и менее приблизительно 16 мг/сутки на субъекта, предпочтительно менее приблизительно 12 мг/сутки на субъекта. В другом варианте осуществления галантамин вводится в субтерапевтической суточной дозе, которая составляет более приблизительно 2 мг/сутки и менее приблизительно 16 мг/сутки на субъекта, предпочтительно менее приблизительно 12 мг/сутки на субъекта.

В другом варианте осуществления в фармацевтической комбинации галантамин вводится в терапевтической дозе, предпочтительно в терапевтической суточной дозе, составляющей более 16 мг/сутки на субъекта; даже более предпочтительно в терапевтической суточной дозе, которая составляет от 16 до 24 мг/сутки на субъекта.

В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая комбинация в соответствии с настоящим изобретением представляет собой фармацевтическую комбинацию, содержащую метморфин и галантамин, при этом как метморфин, так и галантамин вводятся в субтерапевтической дозе. В указанном контексте метморфин вводится в субтерапевтической суточной дозе, составляющей максимум приблизительно 1500 мг/сутки на субъекта, предпочтительно максимум приблизительно 1000 мг/сутки на субъекта; более предпочтительно в субтерапевтической суточной дозе, которая составляет приблизительно 5 мг/сутки или больше и максимум приблизительно 1500 мг/сутки на субъекта; даже более предпочтительно в субтерапевтической суточной дозе от приблизительно 5 мг/сутки до при-

близительно 1000 мг/сутки на субъекта. Также в указанном контексте галантамин вводится в субтерапевтической суточной дозе, составляющей менее приблизительно 16 мг/сутки на субъекта; даже более предпочтительно в субтерапевтической дозе, которая составляет более приблизительно 0,08 мг/сутки и менее приблизительно 16 мг/сутки на субъекта, предпочтительно менее приблизительно 12 мг/сутки на субъекта. В еще одном более предпочтительном варианте осуществления субтерапевтическая суточная доза составляет более приблизительно 2 мг/сутки и менее приблизительно 16 мг/сутки на субъекта, предпочтительно менее приблизительно 12 мг/сутки на субъекта. В еще более предпочтительном варианте осуществления субтерапевтическая суточная доза составляет от 3 до 12 мг/сутки на субъекта.

В другом аспекте изобретения фармацевтическую комбинацию во всех различных вариантах осуществления настоящего изобретения получают для перорального введения или любого другого типа неинвазивного введения.

Настоящее изобретение можно обобщить с помощью следующих пронумерованных вариантов осуществления.

1. Применение фармацевтической комбинации для лечения, предупреждения, и/или уменьшения симптомов возрастных и/или дегенеративных заболеваний у субъекта,

при этом указанная фармацевтическая комбинация содержит метморфин и галантамин; и

при этом возрастные и/или дегенеративные заболевания представляют собой заболевания нервно-скелетной мышечной системы, дряблость, и воспалительное заболевание печени.

2. Применение в соответствии с вариантом осуществления 1, где указанные представляют собой заболевания нервно-скелетно-мышечной системы и/или дряблость.

3. Применение в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где возрастные и/или дегенеративные заболевания нервно-скелетно-мышечной системы выбраны из группы, включающей экстрапирамидные и двигательные нарушения, заболевания нервно-мышечного соединения и мышц, системные атрофии, поражающие в первую очередь центральную нервную систему, мышечную дистрофию, мышечную дистрофию Дюшенна, спинальную мышечную атрофию и сопутствующие заболевания, заболевания двигательных нейронов, такие как амиотрофический латеральный склероз, аномальные непроизвольные движения, аномалии походки и подвижности, атаксию, ассоциированные с митохондриями нервно-скелетно-мышечные заболевания и саркопению.

4. Применение в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где возрастные и/или дегенеративные заболевания нервно-скелетно-мышечной системы представляют собой экстрапирамидные и двигательные нарушения, заболевания нервно-мышечного соединения и мышц, системные атрофии, поражающие в первую очередь центральную нервную систему, мышечную дистрофию, мышечную дистрофию Дюшенна, спинальную мышечную атрофию и сопутствующие заболевания, заболевания двигательных нейронов, такие как амиотрофический латеральный склероз, аномальные непроизвольные движения, аномалии походки и подвижности или атаксию.

5. Применение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-4, где возрастное и/или дегенеративное заболевание нервно-скелетно-мышечной системы представляет собой саркопению.

6. Применение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-4, где возрастные и/или дегенеративные заболевания нервно-скелетно-мышечной системы представляют собой ассоциированные с митохондриями нервно-скелетно-мышечные заболевания, в частности ассоциированные с митохондриями нервно-скелетно-мышечные заболевания, выбранные из заболеваний центрального стержня и заболеваний, ассоциированных с атрофией зрительного нерва I типа (OPA1).

7. Применение фармацевтической комбинации для предупреждения, стабилизации и/или уменьшения количества жалоб, связанных с возрастными заболеваниями, и/или жалоб, связанных с дегенеративными заболеваниями, при этом указанная фармацевтическая комбинация содержит метморфин и галантамин, где жалобы, связанные с возрастными заболеваниями, и/или жалобы, связанные с дегенеративными заболеваниями, выбраны из группы, включающей мышечную слабость, сниженную мышечную силу, нервно-мышечную дегенерацию, сниженную подвижность, нарушенный иммунный ответ, нарушение метаболизма, общую слабость.

8. Применение фармацевтической комбинации для улучшения показателя продолжительности жизни и/или продолжительности жизни с сохранением здоровья, при этом указанная фармацевтическая комбинация содержит метморфин и галантамин, где улучшенный показатель продолжительности жизни и/или продолжительности жизни с сохранением здоровья выбраны из группы, включающей ослабление или стабилизацию жалоб, связанных с возрастными заболеваниями, ослабление или стабилизацию дегенеративной дисфункции и жалоб, связанных с дегенеративными заболеваниями, относительно состояния субъекта до введения фармацевтической комбинации или относительно контрольной популяции, и при этом жалобы, связанные с возрастными заболеваниями, и/или жалобы, связанные с дегенеративными заболеваниями, выбраны из группы, включающей мышечную слабость, сниженную мышечную силу, нервно-мышечную дегенерацию, сниженную подвижность, нарушенный иммунный ответ, нарушение метаболизма, общую слабость.

9. Применение фармацевтической комбинации в соответствии с вариантом осуществления 7 или 8, где жалобы, связанные с возрастными заболеваниями, и/или жалобы, связанные с дегенеративными за-

болеваниями, выбраны из группы, включающей мышечную слабость, сниженную мышечную силу, нервно-мышечную дегенерацию и сниженную подвижность.

10. Применение фармацевтической комбинации в соответствии с вариантом осуществления 7 или 8, где жалоба, связанная с возрастными заболеваниями, и/или жалоба, связанная с дегенеративными заболеваниями, представляет собой общую слабость.

11. Применение в соответствии с вариантами осуществления 1-6, где метформин и галантамин вводятся субъекту в субтерапевтической дозе.

12. Применение фармацевтической комбинации в соответствии с любым из вариантов осуществления 7-10, где метформин и галантамин вводятся субъекту в субтерапевтической дозе.

13. Применение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-6, где субъект представляет собой субъекта-человека.

14. Применение фармацевтической комбинации в соответствии с любым из вариантов осуществления 7-10, где субъект представляет собой субъекта-человека.

#### Краткое описание графических материалов

Посредством конкретной ссылки на фигуру подчеркивается, что показанные подробности приведены лишь в качестве примера и в целях иллюстративного рассмотрения различных вариантов осуществления настоящего изобретения. Они приведены по причине представления того, что считается наиболее применимым и легко доступным описанием идей и концептуальных аспектов настоящего изобретения. В связи с этим не предпринимается попытка показать структурные детали настоящего изобретения подробнее, чем это необходимо для фундаментального понимания настоящего изобретения. Описание, взятое совместно с графическими материалами, поясняет специалистам в данной области техники, как можно реализовать на практике несколько форм настоящего изобретения.

На фиг. 1 показан анализ продолжительности жизни с использованием *C. elegans* для оценки способствующего продлению жизни эффекта однократной дозы метформина, галантамина и комбинации метформина и галантамина. Показаны объединенные данные нескольких анализов, измеряющих выживаемость *C. elegans*. Обработку начинали в первый день половозрелой жизни и животным вводили препараты однократно. Полные данные о продолжительности жизни представлены в табл. 1.

На фиг. 2 показан анализ продолжительности жизни с использованием *C. elegans* для оценки способствующего продлению жизни эффекта многократного введения метформина, галантамина и комбинации метформина и галантамина. Обработку начинали в первый день половозрелой жизни и животным вводили препараты многократно. Полные данные о продолжительности жизни представлены в табл. 1.

На фиг. 3 показано однократное введение галантамина и/или метформина *C. elegans*, которое положительно влияет на несколько параметров двигательной активности (т.е. на среднюю активность (A) и максимальную активность (B)) во время старения, а также на среднее количество "дней жизни с сохранением здоровья" (C). Последний параметр представляет собой параметр продолжительности жизни с сохранением здоровья, определяемый как количество дней, в течение которых активность животного превышает 15% от средней максимальной активности необработанного контрольного состояния (в рамках того же анализа). На панелях A и B исходная активность (т.е. до раздражителя синим светом) показана слева от пунктирной линии, в то время как стимулированная активность (т.е. после раздражителя синим светом) показана справа от пунктирной линии. Планки погрешностей обозначают SEM. Уровни статистической значимости (и процентные изменения) приведены относительно необработанного контроля внизу каждой диаграммы. Статистическая значимость по сравнению с "25 mM Met+100 мкM Gal" обозначена с помощью дополнительных линий. \*  $P_{ANOVA} < 0,05$ , \*\*  $P_{ANOVA} < 0,01$ , \*\*\*  $P_{ANOVA} < 0,001$ , NS=не значимо.

На фиг. 4 показано многократное введение многократных доз галантамина и/или метформина *C. elegans*, которое положительно влияет на многочисленные двигательные и поведенческие параметры у половозрелых особей пострепродуктивного возраста (средняя скорость (A), максимальная скорость (B), доля времени, занятого перемещением (C), занятость клеток (D)). Планки погрешностей обозначают SEM. Уровни статистической значимости (и процентные изменения) приведены относительно необработанного контроля внизу каждой диаграммы. Статистическая значимость по сравнению с "25 mM Met +100 мкM Gal" обозначена с помощью дополнительных линий. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS=не значимо. Полные данные о двигательной активности отображены в табл. 2.

На фиг. 5 показана комбинация 25 mM Met с ингибиторами ацетилхолинэстеразы Don и Riv или подобным ингибитору ацетилхолинэстеразы соединением Mem, которая вызывает очень похожий фенотип двигательной активности, что и комбинация 25 mM Met с ингибитором ацетилхолинэстеразы Gal (средняя скорость (A), максимальная скорость (B), доля времени, занятого перемещением (C), занятость клеток (D)). Уровни статистической значимости (и процентные изменения) приведены относительно необработанного контроля внизу каждой диаграммы. \*  $p < 0,05$ , NS=не значимо. Полные данные о двигательной активности отображены в табл. 3.

На фиг. 6 показана транскрипция гена цитопротекторной глутатион-S-трансферазы 4 (*gst-4*) активируется Met и Gal синергетическим образом. Показаны данные анализа транскрипции генов *in vivo* у *C. elegans*. Каждый круг (биологическая копия) состоит из тысяч животных. Планки погрешностей обозначают SEM. Показаны объединенные данные трех независимых анализов. Уровни статистической зна-

чимости (и процентные изменения) приведены относительно необработанного контроля внизу. Статистическая значимость по сравнению с "25 mM Met+100 мкМ Gal" обозначена с помощью дополнительных линий. \*\*\*  $P_{ANOVA} < 0,001$ , NS=не значимо.

На фиг. 7 для половозрелых особей *C. elegans*, обработанных комбинацией Met и Gal, показана улучшенная морфология мышц по сравнению с необработанными контрольными животными. (A) Соотношение сторон представляет собой измерение длины и ширины миофиламента, в то время как (B) гладкость представляет собой показатель идеального контура миофиламента. Уровни статистической значимости (и процентные изменения) приведены относительно необработанного контрольного состояния. \*  $P_{ANOVA} < 0,05$ , NS=не значимо.

Фиг. 8 иллюстрирует, что у мышей  $^{-/-}$  по экспрессии мышечно-специфического Opa1, обработанных комбинацией метформина и галантамина, поддерживалась масса жировой ткани, восстанавливался метаболизм и был предупрежден стеатоз печени. (A) Вес тела, (B) мышечная масса и (C) масса жировой ткани, измеренные у самок мышей Opa1<sup>fl/fl</sup> (контроль), Opa1 $^{-/-}$ , получавших и не получавших добавку метформина с галантамином после обработки тамоксифеном. (D) Содержание белой жировой ткани (WAT) у самок мышей Opa1<sup>fl/fl</sup>, Opa1 $^{-/-}$ , получавших и не получавших добавку метформина и галантамина. (E) Потребление пищи. (F-H) Метаболический ответ *in vivo* на обработку комбинацией. (F) Потребление кислорода (VO<sub>2</sub>), (G) образование углекислого газа (VCO<sub>2</sub>), (H) расход энергии, (I) уровни воспалительного IL6 в скелетных мышцах. Данные представляют собой среднее значение  $\pm$ SEM, самки: n=2-4, самцы: n=3, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ .

На фиг. 9 показана комбинация метформина и галантамина, улучшавшая физические характеристики у мышей  $^{-/-}$  по экспрессии мышечно-специфического Opa1. (A) Время бега на беговой дорожке и (B) сила захвата, измеренные у самок мышей Opa1 $^{-/-}$  с обработкой и без обработки метформином и галантамином через 60 и 50 дней после обработки тамоксифеном соответственно. (C-F) Кривые зависимости силы от частоты, полученные *in vivo* для икроножных мышц. (C, D) Абсолютная сила и (E, F) и максимальная удельная сила, генерируемая во время тетанического сокращения у самок и самцов мышей Opa1 $^{-/-}$  соответственно, обработанных и не обработанных метформином и галантамином. Данные представляют собой среднее значение  $\pm$ SEM, самки: n=2-4, самцы: n=3, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

На фиг. 10 показана комбинация метформина и галантамина, частично обеспечивавшая сохранение мышечной массы у мышей Opa1 $^{-/-}$ . (A-F) Значения мышечной массы для самок и самцов мышей контролей (Opa1<sup>fl/fl</sup>), Opa1 $^{-/-}$ , получавших и не получавших добавку метформина и галантамина соответственно. (A, D) Передняя большеберцовая мышца. (B, E) Икроножная мышца. (C, F) Камбаловидная мышца. (G) Количественная оценка количества миофибрилл и (H) денервированных NCAM-положительных волокон у самок мышей контроля (Opa1<sup>fl/fl</sup>), Opa1 $^{-/-}$ , обработанных и не обработанных метформином и галантамином. Данные представляют собой среднее значение  $\pm$ SEM, самки: n=2-4, самцы: n=3, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  и \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение направлено на фармацевтическую комбинацию для применения в лечении, предупреждении, стабилизации, задержке начала проявления и/или уменьшении симптомов возрастных и/или дегенеративных заболеваний, в частности, возрастных и/или дегенеративных заболеваний нервно-скелетно-мышечной системы, саркопении и/или дряблости.

В контексте настоящего изобретения термин "лечить" или "лечение" относится к действию, приводящему к радикальному лечению или к уменьшению или ослаблению тяжести симптома, заболевания или состояния, или к уменьшению частоты возникновения рецидивов заболевания или нарушения. Термины включают купирующее лечение нарушения (т.е. лечение, которое вызывает вхождение нарушения в ремиссию). Термин "лечить" или "лечение" включает введение средства, при котором заболевание или состояние по меньшей мере частично нормализуется или ослабевает, и/или имеется некоторое облегчение, ослабление или уменьшение по меньшей мере одного клинического симптома, и/или имеется задержка прогрессирования состояния или заболевания, и/или предупреждение или задержка начала проявления состояния или заболевания. Таким образом, термины "лечить" и "лечение" относятся как к профилактическому, так и к терапевтическому схемам лечения. Термин "лечение" используется в данном документе взаимозаменяемо с термином "терапевтический способ" и относится как к терапевтическим, так и к профилактическим/превентивным мерам. Лица, нуждающиеся в лечении, могут включать индивидуумов, уже страдающих определенным медицинским нарушением, а также тех, у кого в конечном итоге может развиться нарушение (т.е. тех, кто нуждается в превентивных мерах).

Как используется в данном документе, термин "предупреждение" или "профилактика" относится к способам, с помощью которых снижается риск развития заболевания, состояния или симптома. Предупреждение включает снижение риска развития заболевания или состояния и/или предупреждение ухудшения симптомов или прогрессировать заболевания или снижение риска ухудшения симптомов или прогрессирования заболевания или состояния.

Как используется в данном документе, термин "стабилизация" симптомов возрастных или дегенеративных заболеваний относится к состоянию, при котором отсутствует как уменьшение, так и увеличе-

ние количества и/или степени тяжести симптомов.

Как используется в данном документе, термин "комбинация" относится к любой ассоциации между двумя или более элементами. Ассоциация может быть пространственной или относиться к применению двух или более элементов для достижения общей цели.

Как используется в данном документе, термин "композиция" относится к любой смеси двух или более продуктов или соединений (например, средств, модуляторов, регуляторов и т.д.). Она может представлять собой раствор, суспензию, жидкость, порошок или пасту, водные или неводные составы или любую их комбинацию.

Таким образом, настоящее изобретение направлено на фармацевтическую комбинацию, содержащую бигуанид и/или его N-оксид, гидрат, фармацевтически приемлемую соль или сольват и ингибитор ацетилхолинэстеразы и/или его N-оксид, гидрат, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

Подразумевается, что формы N-оксидов включают соединения, в которых один или более атомов азота окислены до так называемого N-оксида.

Для фармацевтического применения соединения по настоящему изобретению можно применять в виде свободной кислоты или основания и/или в форме фармацевтически приемлемой соли присоединения кислоты и/или соли присоединения основания (например, полученной с помощью нетоксичной органической или неорганической кислоты или основания), в форме гидрата, сольвата и/или комплекса и/или в форме пролекарства или предлекарства, такого как сложный эфир. Как используется в данном документе и если не указано иное, термин "сольват" включает любую комбинацию, которая может быть образована соединением по настоящему изобретению с подходящим неорганическим растворителем (например, гидратами) или органическим растворителем, таким как без ограничения спирты, кетоны, сложные эфиры и т.п. Такие соли, гидраты, сольваты и т.д. и их получение будут понятны специалисту в данной области техники; ссылка делается, например, на соли, гидраты, сольваты и т.д., описанные в US-A-6372778, US-A-6369086, US-A-6369087 и US-A-6372733.

Фармацевтически приемлемые соли соединений в соответствии с настоящим изобретением, т.е. в форме водо-, маслорастворимых или диспергируемых продуктов, включают обычные нетоксичные соли или соли четвертичного аммония, которые образуются, например, из неорганических или органических кислот или оснований. Примеры таких солей присоединения кислоты включают ацетат, адипат, альгинат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептаноат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, оксалат, пальмоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, пикрат, пивалат, пропионат, сукцинат, тартрат, тиоцианат, тозилат и ундеcanoат. Основные соли включают соли аммония, соли щелочных металлов, такие как соли натрия и калия, соли щелочноземельных металлов, такие как соли кальция и магния, соли с органическими основаниями, такие как соли дициклогексиламина, N-метил-D-глюкамин, и соли с аминокислотами, такими как аргинин, лизин и т.д. Кроме того, основные азотсодержащие группы могут быть кватернизованы такими средствами, как низшие алкилгалогениды, такие как метил-, этил-, пропил- и бутилхлорид, бромиды и йодиды; диалкилсульфаты, такие как диметил-, диэтил-, дибутил-; и диамилсульфаты, длинноцепочечные галогениды, такие как децил-, лаурил-, миристил- и стеарилхлориды, бромиды и йодиды, аралкилгалогениды, такие как бензил- и фенэтилбромиды, и другие. Другие фармацевтически приемлемые соли включают сульфатную соль этанолата и сульфатные соли.

Как правило, для фармацевтического применения соединения по настоящему изобретению могут быть составлены в виде фармацевтического препарата или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно соединение по настоящему изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество и/или вспомогательное средство и необязательно один или более дополнительных фармацевтически активных соединений.

Посредством неограничивающих примеров такой состав может находиться в форме, подходящей для перорального введения, для парентерального введения (например, путем внутривенной, внутримышечной или подкожной инъекции или внутривенной инфузии), для местного применения (в том числе глазного), для введения с помощью ингаляции, с помощью кожного пластыря, с помощью имплантата, с помощью суппозитория и т.д. Такие подходящие формы введения, которые могут быть твердыми, полутвердыми или жидкими, в зависимости от способа введения, а также способы и носители, разбавители и вспомогательные вещества для применения при их получении, будут очевидны специалисту в данной области техники; ссылка снова сделана, например, на US-A-6372778, US-A-6369086, US-A-6369087 и US-A-6372733, а также на стандартные справочники, такие как последнее издание Remington's Pharmaceutical Sciences.

В контексте настоящего изобретения "возрастное заболевание" относится к аномальному состоянию, характеризующемуся нарушенным или неправильным функционированием органа, части, структуры или системы тела, которое чаще встречается у пожилых людей. Кроме того, в контексте настоящего описания "дегенеративное заболевание" относится к заболеванию, которое является результатом непрерывного процесса, основанного на дегенеративных клеточных изменениях, влияющих на ткани или ор-

ганы, которые со временем будут ухудшаться.

В контексте настоящего изобретения возрастные и/или дегенеративные заболевания включают без ограничения иммунные заболевания, эндокринные и метаболические заболевания, заболевания системы кровообращения, артропатии, заболевания пищеварительной системы, заболевания нервно-скелетно-мышечной системы, в том числе саркопению и дряблость. Иммунные заболевания выбраны из группы, включающей дисфункцию иммунной системы, связанную с возрастными заболеваниями, сниженный иммунный ответ, связанный с возрастными заболеваниями, такой как, например, сниженный иммунный ответ на вакцинацию, бактериальные инфекционные заболевания, вирусные инфекционные заболевания. Эндокринные и метаболические заболевания выбраны из группы, включающей ожирение, метаболический синдром, диабет II типа и прогерия. Заболевания системы кровообращения выбраны из группы, включающей атеросклероз, ишемическую болезнь сердца, болезнь периферических артерий и инсульт. Артропатии выбраны из группы, включающей ревматоидный артрит и остеоартрит. Заболевания пищеварительной системы выбраны из группы, включающей гастрит, язвенную болезнь, воспалительное заболевание печени, расстройства пищеварительного тракта и запор. Заболевания нервно-скелетно-мышечной системы выбраны из группы, включающей экстрапирамидные и двигательные нарушения, заболевания нервно-мышечного соединения и мышц, системные атрофии, поражающие в первую очередь центральную нервную систему, мышечную дистрофию, мышечную дистрофию Дюшенна, спинальную мышечную атрофию и сопутствующие заболевания, заболевания двигательных нейронов, такие как амиотрофический латеральный склероз, аномальные произвольные движения, аномалии походки и подвижности, атаксию, ассоциированные с митохондриями заболевания и саркопению.

Заболевания, вызванные дисфункцией, ассоциированной с митохондриями, связаны с нейродегенеративными, неопластическими, эндокринными и сердечно-сосудистыми заболеваниями. В настоящем изобретении возрастные и/или дегенеративные ассоциированные с митохондриями заболевания представляют собой заболевания, ассоциированные с ухудшенным или нарушенным функционированием митохондрий, в частности, ведущие к нервно-скелетно-мышечным дисфункциям. Указанные заболевания выбраны из заболеваний центрального стержня и ассоциированных с атрофией зрительного нерва I типа заболеваний (OPA1). Заболевание центрального стержня представляет собой наследственное нервно-мышечное нарушение, ассоциированное с нарушением функции митохондрий. Заболевание характеризуется участками со сниженной окислительной активностью, проходящими вдоль продольной оси мышечного волокна ("центральные стержни"), и клиническими признаками врожденной миопатии. OPA1 находится во внутренней митохондриальной мембране и способствует регуляции стабильности митохондрий и выработку энергии. Мутации в гене OPA1 были ассоциированы с атрофией зрительного нерва I типа, которая представляет собой доминантно наследуемую оптическую нейропатию, приводящую к прогрессирующей потере остроты зрения, ведущей во многих случаях к слепоте.

Как используется в данном документе, термин "саркопения" означает потерю массы, качества и силы скелетных мышц. Саркопения может приводить к дряблости, например, у пожилых людей.

Термин "дряблость" относится к неблагоприятному, в первую очередь геронтологическому состоянию здоровья, которое может включать низкий функциональный резерв, ускоренный остеопороз, легкое утомление, сниженную мышечную силу, высокую подверженность заболеваниям и снижение либидо (например, см. Bandeen-Roch et al., *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 61:262-266, 2006). Дряблость можно охарактеризовать по трем из следующих пяти признаков: необъяснимое снижение веса, мышечная слабость, низкая скорость ходьбы, истощение и низкая физическая активность. Кроме того, уменьшение дряблости или стабилизация ухудшения дряблости характеризуется одним или более из следующих параметров: увеличенная сила, стабилизация потери силы, увеличение мышечной массы тела, стабилизация потери веса, улучшенная подвижность, стабилизация снижения подвижности, увеличенный уровень энергии, стабилизация потери энергии, повышенные уровни активности, стабилизация потери активности, повышенная выносливость, стабилизация потери выносливости, усиленная поведенческая реакция на сенсорный сигнал, стабилизация поведенческой реакции на сенсорный сигнал, снижение или стабилизация уровня одного или более маркеров воспаления или биомаркеров, улучшение гомеостаза глюкозы и метаболического или катаболического состояния, улучшение нейротрансмиттерной или нервно-мышечной передачи и уменьшение уровня одного или более биомаркеров активации свертывания крови, при этом снижение или стабилизацию рассматриваются относительно состояния субъекта до введения фармацевтической комбинации или относительно контрольной популяции.

Настоящее изобретение дополнительно направлено на применение фармацевтической комбинации для предупреждения, стабилизации и/или уменьшения количества жалоб, связанных с возрастными заболеваниями, и/или жалоб, связанных с дегенеративными заболеваниями. Они выбраны из группы, включающей мышечную слабость, сниженную мышечную силу, нервно-мышечную дегенерацию, сниженную подвижность, нарушенный иммунный ответ, нарушение метаболизма, общую слабость, дряблость.

Как используется в данном документе, термин "мышечная слабость" относится к состоянию, при котором снижается сила одной или более мышц. Термин "мышечная сила" относится к способности мышцы или группы мышц создавать напряжение или прилагать силу посредством скелетной системы.

Термин "скелетная мышца" включает скелетно-мышечную ткань, а также ее компоненты, такие как скелетно-мышечные волокна (т.е. быстрые или медленные скелетно-мышечные волокна), миофибриллы, содержащие скелетно-мышечные волокна, скелетный саркомер, который содержит миофибриллы, и различные компоненты описанного выше скелетного саркомера.

Термин "нервно-мышечная дегенерация" относится к любой дегенерации, которая поражает любую часть нервов и/или мышц.

Термин "сниженная подвижность" относится к сниженной физической подвижности и относится к любому ограничению в независимом целенаправленном физическом движении тела или одной или более конечностей тела.

В контексте настоящего изобретения "нарушенный иммунный ответ" относится к сниженной иммунологической реакции организма, будь то клеточной и/или гуморальной, на патогены, в том числе бактерии и вирусы, или рак.

Используемый в данном документе термин "метаболическое нарушение" относится к любому состоянию, которое ассоциировано с повышенным уровнем глюкозы в плазме крови или липидов в плазме крови.

Термин "общая слабость" относится к ситуации или состоянию слабости, в том числе симптомам усталости, мышечной слабости и наличию функциональных ограничений.

Как используется в данном документе, термин "жалобы, связанные с дегенеративными заболеваниями" используется для обозначения любого дискомфорта или жалоб, которые в конечном итоге приведут к дегенеративному заболеванию.

Как используется в данном документе, термин "подавление развития" или термин "задержка начала проявления" признака старения означает задержку начала, замедление прогрессировать или уменьшение проявления признака старения.

Как используется в данном документе, термин "повышение производительности" относится к любому аспекту производительности, в том числе когнитивной деятельности или физическим характеристикам, например, без ограничения способности быть самодостаточным, заботиться о (некоторых, но не обязательно обо всех) личных потребностях, быть ходячим или иным образом подвижным, или взаимодействовать с другими.

Кроме того, настоящее изобретение направлено на применение фармацевтической комбинации в соответствии с настоящим изобретением для улучшения показателя продолжительности жизни и/или продолжительности жизни с сохранением здоровья. Термин "продолжительность жизни", как используется в данном документе, относится к максимальной продолжительности жизни, наблюдаемой в группе индивидуумов. В качестве альтернативы продолжительность жизни также относится к средней продолжительности жизни, ожидаемой в группе индивидуумов.

Термин "продолжительность жизни с сохранением здоровья" относится к периоду времени, в течение которого индивидуум соответствует одному или более выбранным показателям продолжительности жизни с сохранением здоровья. Увеличение "продолжительности жизни с сохранением здоровья" означает продление периода здорового состояния в соответствии с такими показателями по сравнению с периодом здорового состояния в контрольной популяции. Увеличение продолжительности жизни с сохранением здоровья может быть измерено, например, путем определения продолжительности времени, в течение которого индивидуум продолжает соответствовать выбранному(ым) показателю(ям) продолжительности жизни с сохранением здоровья. В качестве альтернативы увеличение продолжительности жизни с сохранением здоровья может быть определено путем измерения степени улучшения одного или более выбранных показателей продолжительности жизни с сохранением здоровья, которые коррелируют с увеличением продолжительности времени, в течение которого индивидуум продолжает соответствовать выбранным показателям продолжительности жизни с сохранением здоровья. В качестве альтернативы продолжительность жизни с сохранением здоровья представляет собой период жизни, в течение которого индивидуум является полностью функциональным и не страдает хроническими заболеваниями.

Как используется в данном документе, термин "контрольная популяция" относится к популяции, которую не обрабатывали комбинацией в соответствии с настоящим изобретением, при этом члены этой популяции имеют одну или более характеристик и/или состояний субъекта, который подлежит лечению с помощью комбинации по настоящему изобретению. Таким образом, например, если субъект подлежит лечению от дряблости, соответствующая контрольная популяция будет иметь слабость; и если субъект подлежит лечению от любого возрастного заболевания, соответствующая контрольная популяция будет иметь такое же возрастное заболевание.

Термин "маркер воспаления" относится к эндогенному состоянию, часто присутствию, уровню и/или форме молекулы, которое указывает на наличие воспаления. Например, С-реактивный белок (CRP) представляет собой маркер воспаления, который, как было показано, позволяет спрогнозировать будущее сердечно-сосудистые явления у индивидуумов с подтвержденным сердечно-сосудистым заболеванием и без него. Маркеры воспаления, вовлеченные в воспалительный процесс, приводящий к атеротромбозу, включают, например, CRP, адипонектин, хемоаттрактантный белок моноцитов 1 (MCP-1), лиганд CD40 и липопротеин-ассоциированную фосфолипазу A(2) (Lp-PLA(2)).

Термин "гомеостаз глюкозы" относится к состоянию или тенденции к нормальным (непатологическим) уровням глюкозы, которые соответствующим образом изменяются в ответ на различные стимулы. Иллюстративный показатель гомеостаза глюкозы включает стимулированные приемом пищи уровни инсулина, глюкозы и глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1).

Термин "биомаркер активации свертывания" относится к эндогенному состоянию, часто присутствию, уровню и/или форме молекулы, которое указывает на активацию пути, ведущего к образованию сгустка крови. Иллюстративные биомаркеры активации свертывания включают, например, фрагменты протромбина 1 и 2, комплекс тромбин-антитромбин и продукты разложения фибрина.

Термин "старение иммунной системы" относится к постепенному ухудшению иммунной системы, вызванному естественным старением. Он включает как способность субъекта реагировать на инфекции, так и развитие долговременной иммунной памяти, особенно путем вакцинации. Например, старение иммунной системы включает снижение реакции на вакцинацию у пожилых людей.

Термин "субъект", как используется в данном документе, относится к животному, такому как млекопитающее, например, человеку, которое представляет собой или будет представлять собой объект лечения, наблюдения или эксперимента. Способы могут быть пригодны как в терапии человека, так и в путях применения в ветеринарии. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, а в некоторых дополнительных вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В предпочтительном варианте осуществления субъект представляет собой человека. В еще более предпочтительном варианте осуществления субъект представляет собой субъекта-человека с возрастным заболеванием, например, субъекта-человека с возрастным заболеванием старше 50 лет. В другом варианте осуществления субъект представляет собой субъекта-человека с дегенеративным заболеванием. В еще одном варианте осуществления субъект представляет собой субъекта с возрастным заболеванием и дегенеративным заболеванием.

Во всех различных вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическую комбинацию в соответствии с настоящим изобретением можно вводить субъекту, в частности субъекту-человеку, в терапевтической или субтерапевтической суточной дозе.

Термин "субтерапевтическая доза" в случае использования для описания количества бигуанида и/или ингибитора ацетилхолинэстеразы относится к дозе указанных соединений, которая не приводит к необходимому терапевтическому эффекту в отношении заболевания, подлежащего лечению при введении пациенту отдельно. Это также можно назвать "синергетически эффективным количеством", обозначая синергетический эффект, наблюдаемый при совместном введении соединений.

В одном варианте осуществления количество вводимого бигуанида или ингибитора ацетилхолинэстеразы является на приблизительно 20% меньше, чем терапевтически эффективное количество. В другом варианте осуществления количество вводимого бигуанида или ингибитора ацетилхолинэстеразы является на приблизительно 50% меньше, чем терапевтически эффективное количество. В качестве альтернативы количество вводимого бигуанида или ингибитора ацетилхолинэстеразы является на приблизительно 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или 90% меньше, чем терапевтически эффективное количество.

Например, терапевтически эффективное количество метформина в зависимости от пациента и/или состояния, такого как масса тела, может составлять приблизительно 2000 мг/сутки или приблизительно 2500 мг/сутки. Соответственно совокупная субтерапевтическая суточная доза метформина для пациента-человека составляет приблизительно 400 мг/сутки или приблизительно 500 мг/сутки. В другом варианте осуществления совокупная субтерапевтическая суточная доза для пациента-человека составляет приблизительно 1000 мг/сутки или приблизительно 1250 мг/сутки.

Также, например, терапевтически эффективное количество галантамина в зависимости от пациента и/или состояния, такого как масса тела, может составлять приблизительно 16 мг/сутки или приблизительно 24 мг/сутки. Соответственно совокупная субтерапевтическая суточная доза галантамина для пациента-человека составляет приблизительно 3,20 мг/сутки или приблизительно 4,80 мг/сутки. В другом варианте осуществления совокупная субтерапевтическая суточная доза для пациента-человека составляет приблизительно 8 мг/сутки или приблизительно 12 мг/сутки.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической комбинации, содержащей два разных соединения. В этом контексте доступны и широко используются в данной области техники различные способы анализа фармакологических эффектов двух (или более) соединений. Например, термин "синергетические эффекты" относится к явлению, когда величина эффекта комбинации больше, чем сумма отдельных эффектов. Поскольку это определение является очень строгим, особенно с учетом биологической вариабельности, будет применяться модель наибольшей активности отдельного средства (HSA) (Borisy, PNAS, 2013). В соответствии с этой моделью комбинации лекарственных средств считаются синергическими, если комбинаторный эффект значительно превышает максимальный эффект любого из отдельных лекарственных средств в той же концентрации, что и в смеси. В контексте настоящего изобретения синергетические эффекты фармацевтической комбинации по настоящему изобретению считаются значимыми и приводят к физиологическим эффектам.

В экспериментальной части настоящего изобретения авторы настоящего изобретения использовали *C. elegans* в качестве модельного организма для изучения старения (Carretero et al., Curr. Top. Med. Chem.,

2017, Kenyon, Nature, 2010). *Caenorhabditis elegans* представляет собой небольшую нематоду, которая стала одной из наиболее интенсивно изучаемых моделей в биологических исследованиях. Со второй половины 20-го века с помощью этой нематоды было сделано много фундаментальных открытий в естественных науках, включая открытие генетических путей, способствующих увеличению продолжительности жизни. Эти пути остались относительно неизменными в ходе эволюции, что способствует их анализу у простых беспозвоночных, таких как *C. elegans*.

Некоторые изменения, происходящие в процессе старения *C. elegans*, характерны для старения у людей, в том числе сниженную эластичность кожи, уменьшение мышечной массы, потеря мышечной целостности, потеря подвижности и повышенная восприимчивость к инфекциям. Кроме того, с возрастом ухудшаются многие формы обучения и памяти как у *C. elegans*, так и у млекопитающих. Также основные генетические и биохимические сети, лежащие в основе старения и возрастных заболеваний, кажутся эволюционно высоко консервативными. Следовательно, поддающиеся изучению модельные организмы, такие как *C. elegans*, позволяют применять относительно упрощенный и высокопроизводительный подход к изучению и пониманию этих явлений. В настоящее время *C. elegans* используется исследователями во всем мире для расшифровки эволюционно консервативных сигнальных путей, вовлеченных в долголетие, и для оценки терапевтического потенциала вмешательств, направленных на уменьшение старения человека. По сути *C. elegans* сочетает в себе экспериментальные преимущества микроорганизмов (т.е. простоту обращения и экспериментальных манипуляций) с преимуществами многоклеточного контекста (т.е. моделирование сложных процессов, таких как старение организма, патогенез и поведение).

Наиболее распространенный способ измерения старения с помощью *C. elegans* основан на ручной проверке выживаемости червей на покрытых бактериями планшетах с агаром.

Кроме того, в примерах использовали мышиную модель с экспрессией мышечно-специфического белка, ассоциированного с атрофией зрительного нерва 1 типа (OPA1), как показано ниже. Эта модель трансгенных мышей эффективно воспроизводит ключевые патофизиологические аспекты связанной с саркопенией потери мышечной массы и силы, и демонстрирует преждевременное старение (например, седые волосы, кифоз). Делеция OPA1, в частности, в скелетных мышцах, приводит к нарушению функции митохондрий, усилению окислительного стресса и воспалению. Более того, модель мышцы OPA1 является признанной мышечной моделью ассоциированных с митохондриями заболеваний, связанных с OPA1, таких как атрофия зрительного нерва и гипертензия, вызванная атрофией зрительного нерва (Archer, 2013, New Engl. J. Med., 369:23).

### Примеры

Пример 1. Модель *Caenorhabditis elegans*.

Материалы и способы.

Химические соединения, представляющие интерес.

Галантамина гидробромид (Gal; CAS 1953-04-4, ссылка PHR1623), донепезила гидрохлорид (Don; CAS 120011-70-3, ссылка PHR1584), мемантина гидрохлорид (Mem; CAS 41100-52-1, ссылка PHR1886) и 1,1-диметилбигуанида гидрохлорид (Met; CAS 1115-70-4, ссылка D150959) приобретали у компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США). Ривастигмина тартрат (Riv; CAS 129101-54-8, ссылка A18484M) поставляла компания Interquim S.A. (Барселона, Испания). Исходные растворы готовили в сверхчистой воде Milli-Q при 3,8 мг/мл (Gal), 416 мг/мл (Don), 216 мг/мл (Mem) и 100 мг/мл (Riv).

Анализ продолжительности жизни с использованием *Caenorhabditis elegans*.

Штамм N2 *C. elegans* дикого типа получали из Генетического центра *Caenorhabditis* (Университет Миннесоты, США) и культивирован при 20°C на стандартной среде для выращивания нематод (NGM), засеянной тонким слоем *Escherichia coli* OP50, если не указано иное. Продолжительность жизни *C. elegans* измеряли аналогично описанным ранее способам [1, 2]. Первый день половозрелой жизни всегда записывали как день 0. FUDR (5-фтор-2'-дезоксифуридин, Sigma-Aldrich) использовали во всех анализах продолжительности жизни для предупреждения образования потомства. Проводили несколько независимых анализов. Использовали минимум 100 животных на одно условие анализа для того, чтобы обеспечить достаточную статистическую мощность.

Во время "анализа с однократным введением" авторы настоящего изобретения использовали платформу WorMotel для долгосрочной повторной визуализации *C. elegans*. Эта полуавтоматическая платформа позволяет проводить несмещенный продолжительный мониторинг фенотипов старения *C. elegans*, включая ежедневные измерения выживаемости, а также количественную оценку двигательной активности. С момента достижения половозрелого возраста животных помещали в отдельные лунки планшетов для скрининга (т.е. изготовленные микротехнологическими способами чипы WorMotel, приготовленные, как описано в разделе [3]), которые засеивали *E.coli* HT115(DE3) в качестве источника пищи и с добавлением соответствующих соединений в различных дозах (табл. 1). Анализировали планшеты для скрининга в четырех повторностях, при этом все четыре исследуемых условия присутствовали на каждом планшете для скрининга (в рандомизированных положениях). Животных держали на одних и тех же планшетах для скрининга в течение всего эксперимента (т.е. 30 дней). Время смерти определяли как конечное время отличного от нулевого движения. Следует обратить внимание, что эта платформа визуализации несовместима с многократным введением. Авторы настоящего изобретения использовали статистическое

программное обеспечение R для построения кривых выживаемости Каплана-Мейера, расчета средней и медианной продолжительности жизни и проведения всех соответствующих статистических анализов. Для сравнения выживаемости между двумя условиями использовались тесты логрангового критерия (т.е. функцию `survdif` пакета `survival`, скорректированную для множественных сравнений с помощью метода Бенджамини-Хохберга). Соответствующие р-значения называются  $p_{\text{логранг}}$ .

Во время "анализа многократного введения" авторы настоящего изобретения следовали стандартному способу, применяемому в полевых условиях (т.е. ручной проверке выживаемости синхронизированных по возрасту популяций на покрытых бактериями агаровых планшетах [2]), который является надежным и технически относительно простым. Вкратце, по достижении половозрелого возраста животных переносили в стандартные планшеты для анализа NGM (необработанный контроль) или планшеты для анализа NGM с добавлением соответствующих соединений в различных дозах (табл. 1). Животных переносили на свежие стандартные планшеты для анализа NGM или свежие планшеты для анализа NGM с добавлением соответствующих соединений в различных дозах трижды в первую неделю и еженедельно после этого (в течение общей продолжительности 33 дня). Этот график введения соответствует стандартизированному протоколу из *Caenorhabditis Intervention Testing Program (CITP)* [4]. Met добавляли к NGM перед автоклавированием, тогда как Gal пипетировали на засеянные планшеты для анализа (по меньшей мере за два часа до переноса животных на планшеты для анализа). Одинаковый объем жидкости добавляли ко всем планшетам, а также к планшетам с необработанным контролем и в условиях Met (т.е. имитация обработки). Животных, выползших из планшетов для анализа или умерших от внутреннего выщелачивания, исключали из исследования. Количество живых и мертвых червей подсчитывали каждые один-два дня.

Анализ двигательной активности.

Двигательная активность *C. elegans* характеризуется синусоидальными движениями (т.е. изгибами тела) и постепенно уменьшается в течение половозрелой жизни. Как и у других животных, поддержание координированных движений считается основным параметром продолжительности жизни [5]. В частности, максимальная двигательная активность является эффективным показателем общего физического состояния и здоровья *C. elegans* [6], в то время как скорость снижения двигательной активности в среднем возрасте, как было показано, предопределяет конечную продолжительность жизни [7].

А. Отслеживание двигательной активности на основе WormMotel (однократное введение).

Для каждого периода визуализации определяли среднюю и максимальную двигательную активность до и после раздражителя, синего света (как описано в [3]). Полученные в результате значения активности называются "исходной двигательной активностью" и "стимулированной двигательной активностью" соответственно. Высокоподвижные животные дают высокие показатели активности, тогда как медленно передвигающиеся или более старые животные дают низкие показатели активности. "Средняя активность" животного представляет собой среднее значений двигательной активности, которые были обнаружено для этого животного в течение всей продолжительности эксперимента. "Максимальная активность" представляет собой наивысшее значение максимальной двигательной активности, обнаруженное у животного, независимо от дня обнаружения. "Количество дней жизни с сохранением здоровья" определяют как общее количество дней, в течение которых активность живого животного, по наблюдениям, превышала 15% от средней максимальной активности необработанного контрольного состояния, присутствующего в том же техническом повторе (т.е. чипе). Увеличение "количества дней жизни с сохранением здоровья" свидетельствует об увеличении продолжительности жизни с сохранением здоровья, основанной на двигательной активности. Результаты анализировали с использованием однофакторного и двухфакторного ANOVA с поправкой Холма-Сидака для множественных сравнений в программном обеспечении GraphPad Prism. Все соответствующие р-значения называются  $P_{\text{ANOVA}}$ .

В. Отслеживание двигательной активности с помощью камеры (многократное введение).

Чтобы количественно оценить эффекты двигательной активности более подробно, авторы настоящего изобретения использовали автоматизированную систему отслеживания *C. elegans*, которая совместима со стандартными чашками Петри. Многокамерная система слежения позволяет объективно количественно определять среднюю скорость передвижения, максимальную скорость передвижения и множество поведенческих параметров с помощью анализа изображения на основе траектории. Систему использовалась аналогично Reumen et al. [8]. Выполняли два различных анализа. В первом анализе (табл. 2) оценивали эффекты Gal, Met и комбинации обоих соединений на двигательную активность. Это позволило проверить синергетические эффекты между Gal и Met в отношении нескольких параметров двигательной активности. Во втором анализе (табл. 3) авторы настоящего изобретения характеризовали эффекты на двигательную активность комбинации Met с различными ингибиторами ацетилхолинэстеразы (т.е. Gal, Don и Riv), а также комбинации Met с подобным ингибитору ацетилхолинэстеразы соединением Met. Таким образом, авторы настоящего изобретения смогли проверить, существует ли классовый эффект ингибиторов ацетилхолинэстеразы в целом (в комбинации с Met).

Синхронизированных животных дикого типа выращивали в присутствии соответствующих соединений в различных дозах от стадии L4 (т.е. день 0) и FUDR до начала измерения. Введение животным повторяли трижды (в день 2, 4 и 7) путем переноса на планшеты с NGM, обработанные свежедобавлен-

ным соединением. Перед визуализацией для каждого повтора 20 достаточно накормленных живых животных вручную переносили из планшета для культивирования в незасеянный планшет с NGM, а через 5 мин переносили на другой незасеянный планшет с NGM, используемый для визуализации. Получение изображений осуществляли с помощью программного обеспечения для многокамерной съемки StreamPix 6 (камера GigE PRO GP11004M с объективом KOWA LM16JC10M) в течение 11 мин при 2 кадрах в секунду и постоянной экспозиции, после чего червей отслеживали с применением специального кода MATLAB для отслеживания частиц. Для каждого подвижного животного (т.е. животного, которое двигалось по меньшей мере 2 мин в течение периода визуализации) получали как среднюю, так и максимальную скорость передвижения, а также поведенческие показатели "занятость клеток" и "долю времени, занятого перемещением". Последний представляет собой долю времени, в течение которой обнаруживали, что животное перемещается (в отличие от паузы или поворота). Занятость клеток представляет собой показатель, определяющий эффективность пространственного поиска червя. Значения занятости клеток представляют собой количество уникальных клеток (квадраты 1 мм<sup>2</sup>), которые червь посетил в течение периода визуализации. Оба поведенческих параметра снижаются с возрастом. Эксперименты проводили в трех повторностях (или четырех повторностях) с 20 червями в каждом состоянии на повторность. Результаты анализировали с использованием множественного t-критерия с поправкой Холма-Сидака для множественных сравнений в программном обеспечении GraphPad Prism. Соответствующие р-значения обозначаются р.

Анализ активности генов *in vivo*.

Прозрачное тело *C. elegans* позволяет проводить прямые и неинвазивные измерения транскрипции генов *in vivo* с помощью трансгенных флуоресцентных репортеров [9]. Авторы настоящего изобретения измеряли транскрипцию GFP-репортера *gst-4<sub>p</sub>::GFP* *C. elegans* для получения представления о внутриклеточных сигнальных сетях, на которые влияют Met и/или Gal. Кроме того, авторы настоящего изобретения проверяли, обладают ли Met и Gal синергическим или потенцирующим действием в отношении активации транскрипции гена *gst-4*.

Ген *gst-4* кодирует цитопротекторный и метаболизирующий лекарственные средства фермент глутатион-S-трансферазу 4 (GST-4). *Gst-4* представляет собой прямую мишень для SKN-1, ортолога семейства белков фактора 2, связанного с ядерным фактором E (Nrf2) млекопитающих, который является ключевым фактором транскрипции, участвующим в защите от окислительного и ксенобиотического стрессов. В ответ на окислительные воздействия SKN-1/Nrf2 фосфорилируется PMK-1/p38 MAPK (среди прочих) в цитоплазме, после чего он мигрирует в ядро для индукции экспрессии широкого спектра антиоксидантных и детоксицирующих ферментов, таких как *gst-4*. В исследованиях старения с помощью *C. elegans* активация транскрипции *gst-4* часто используется для считывания активности SKN-1. Тем не менее, было показано, что *gst-4* может также транскрипционно активироваться с помощью сигнального пути эпидермального фактора роста (EGF) посредством EOR-1, фактора транскрипции ВТВ/белка с цинковым пальцем, подобного белку с цинковым пальцем при промиелоцитарном лейкозе млекопитающих (PLZF). Повышенная регуляция детоксицирующих ферментов GST является общей чертой долгоживущих *C. elegans* и связана с долгожительством не только у червей, но и у разных видов, в том числе человека [10].

Флуоресценцию GFP определяли количественно с использованием автоматизированного способа, как описано ранее [11]. Вкратце животных JMET69 с генотипом *Is[gst-4(1491 bp)::gfp; unc-119(+)]*; *Is[unc-54<sub>p</sub>::mCherry;unc-119(+)]* выращивали в присутствии или в отсутствие лекарственных средств (т.е. Met и/или Gal) на планшетах NGM, засеянных OP50 *E.coli*, от L1 до стадии поздней L4, до переноса в 96-луночный планшет для количественной оценки флуоресценции. Показаны значения с поправкой относительно фона. Нормализацию с помощью BCA не применяли. Средние значения статистически сравнивали с помощью однофакторного ANOVA с использованием критерия множественного сравнения Сидака в программном обеспечении GraphPad Prism. Соответствующие р-значения называются  $P_{ANOVA}$ .

Количественная оценка морфологии и разрушения мышц у *C. elegans*

Прогрессирующая потеря мышечной массы и функции с возрастом у *C. elegans* демонстрирует прогрессировать, очень похожее на саркопению у человека [12]. Саркомеры представляют собой фундаментальные мышечные единицы, отвечающие за сокращение мышц. Саркомеры *C. elegans* состоят из чередующихся филаментов, содержащих миозин и актин, подобно саркомерам позвоночных. В то время как миофиламенты саркомеров в стенке тела молодых животных организованы в параллельные симметричные ряды, миофиламенты саркомеров у более старых животных становятся все более дезорганизованными, приобретая более неправильную форму и ориентацию.

Посредством применения трансгенного репортерного штамма, который имеет слияние тяжелой цепи миозина с флуоресцентным GFP (штамм RW1596; *myo-3<sub>p</sub>::MYO-S::GFP*), мышечную структуру *C. elegans* можно визуализировать *in vivo*. В сочетании с конфокальной микроскопией и биоинформатическим анализом это дает не только качественные, но и количественные данные для оценки организационного уровня мышечных волокон. Аналитический способ количественного определения разрушения мышц был оптимизирован в лаборатории профессора Барта Брекмана (UGent; неопубликованные данные). Эту методику авторы настоящего изобретения применяли для проверки того, демонстрируют ли животные,

обработанные с помощью Gal и/или Met, мышечный фенотип, напоминающий фенотип более молодых необработанных индивидуумов.

Синхронизированных животных RW1596 выращивали в присутствии соответствующих соединений в различных дозах (см. фиг. 7) и FUdR, начиная со стадии L4 (т.е. дня 0) и далее. Введение животным повторяли однократно, на день 7, путем переноса на планшеты с NGM, обработанные свежедобавленным соединением. Измерения проводили в позднем половозрелом возрасте (т.е. на день 14) с использованием по меньшей мере 30 животных в каждом состоянии.

Для каждого животного получали два морфологических показателя "соотношение сторон" и "гладкость".

Соотношение сторон представляет собой показатель общего размера (т.е. удлиненную форму) саркомера. Чем выше это значение, тем саркомер является более вытянутым. Соотношение сторон рассчитывается как отношение длины по большой оси (=длина) к длине по малой оси (=ширина) для отдельных миофиламентов внутри саркомера. По мере того как животные стареют, соотношение сторон уменьшается. Гладкость представляет собой показатель гладкости контуров миофиламентов. Чем ниже это значение, тем более "зубчатым" и "деформированным" является край миофиламента. Гладкость обозначается в условных единицах. Значение 1 соответствует максимальной гладкости, наблюдаемой в мышечных волокнах (т.е. в раннем половозрелом возрасте), тогда как значение 0 соответствует гладкости, наблюдаемой у очень старых (день 18) контрольных червей. Два условия сравнивали статистически с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Результаты.

Синергетический эффект комбинации метформина и галантамина в отношении увеличения продолжительности жизни.

Однократное введение отдельных соединений значительно повышало выживаемость *C. elegans* по сравнению с необработанным контролем (Met:  $p_{\text{логранг.}}=0,00215$ ; Gal:  $p_{\text{логранг.}}=0,000176$ ) (фиг. 1, табл. 1). Для проверки синергии лекарственных средств авторы настоящего изобретения использовали модель наибольшей активности отдельного средства (HSA) [13]. В соответствии с этой моделью комбинации лекарственных средств считаются синергическими, если комбинаторный эффект значительно превышает максимальный эффект любого из отдельных лекарственных средств. С применением этой модели авторы настоящего изобретения обнаружили синергию лекарственных средств, поскольку обработка с помощью 25 мМ Met и 100 мкМ Gal приводила к дальнейшему увеличению выживаемости по сравнению с отдельными соединениями (Met:  $p_{\text{логранг.}}=0,049$ ; Gal:  $p_{\text{логранг.}}=0,0244$ ) (фиг. 1).

Более сильный потенцирующий эффект комбинации Met и Gal наблюдали у животных, которым многократно вводили Met и Gal (фиг. 2, табл. 1). В этом случае также комбинация обоих лекарственных средств (Met и Gal) вызывала наиболее сильное увеличение продолжительности жизни: средняя продолжительность жизни увеличилась на 22,1% по сравнению с необработанным контролем ( $p_{\text{логранг.}} < 1E-6$ ), на 12,5% по сравнению с обработанной с помощью Gal группой ( $p_{\text{логранг.}}=0,000006$ ) и на 8,3% по сравнению с обработанной с помощью 25 мМ Met группой ( $p_{\text{логранг.}}=0,037$ ). Максимальная продолжительность жизни животных, обработанных с помощью комбинации Gal и Met, увеличивалась на 29% по сравнению с необработанным контролем, на 23% по сравнению с обработанной с помощью Gal группой и на 17% по сравнению с обработанной с помощью Met группой. В целом комбинация лекарственных средств Met и Gal вызывала значительно большие эффекты на выживаемость, чем наибольший эффект, производимый любым из ее отдельных компонентов (табл. 1), что указывает на синергетический эффект между Met и Gal.

В табл. 1 представлены подробные данные о выживаемости, полученные при анализе продолжительности жизни с использованием *C. elegans*. Обработка с помощью Met, Gal, а также комбинации Met и Gal значительно увеличивает выживаемость половозрелых *C. elegans*. Показаны объединенные данные нескольких анализов. N - общее количество наблюдаемых смертей для каждого состояния, SEM - стандартная ошибка среднего, LS - продолжительность жизни, MLS - средняя продолжительность жизни, \*  $p_{\text{логранг.}} < 0,05$ , \*\*  $p_{\text{логранг.}} < 0,01$ , \*\*\*  $p_{\text{логранг.}} < 0,001$ , \*\*\*\*  $p_{\text{логранг.}} < 0,0001$ . Медианная продолжительность жизни (медианное значение LS) определяется как день, в который 50% животных все еще живы (т.е. 50-й квантиль кривой выживаемости). Максимальная продолжительность жизни (максимальное значение LS) определяется как день, в который 10% животных все еще живы (т.е. 90-й квантиль кривой выживаемости).

Таблица 1

| Состояние                    | [Gal]<br>(мкМ) | [Met]<br>(мМ) | MLS ±<br>SEM<br>(дни) | Медианное значение LS<br>(дни) | Максимальное значение LS<br>(дни) | Повышение по сравнению с необработанным контролем | Снижение по сравнению с комбинацией Met25+Gal100 | N   |
|------------------------------|----------------|---------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---|--|-----|
| <b>Однократное введение</b>  |                |               |                       |                                |                                   |   |  |     |
| Необработанный               | 0              | 0             | 17,41 ± 0,44          | 18                             | 25                                |   | -14,8%****                                       | 170 |
| Gal, 100                     | 100            | 0             | 19,63 ± 0,44          | 20                             | 27                                | +12,8%***   | -3,9%*   | 183 |
| Met, 25                      | 0              | 25            | 19,08 ± 0,58          | 20                             | 28                                | +9,6%**   | -6,7%*   | 127 |
| Met, 25 + Gal, 100           | 100            | 25            | 20,44 ± 0,52          | 21                             | 29                                | +17,5%****  |  | 153 |
| <b>Многократное введение</b> |                |               |                       |                                |                                   |   |  |     |
| Необработанный               | 0              | 0             | 15,80 ± 0,31          | 16                             | 21                                |   | -18,1%****                                       | 148 |
| Gal, 100                     | 100            | 0             | 16,87 ± 0,32          | 17                             | 22                                | +6,8%*  | -12,5%****                                       | 149 |
| Met, 25                      | 0              | 25            | 17,68 ± 0,50          | 18                             | 23                                | +11,9%****  | -8,3%  | 116 |
| Met, 25 + Gal, 100           | 100            | 25            | 19,29 ± 0,57          | 20                             | 27                                | +22,1%***   |  | 87  |

Однократное введение *C. elegans* комбинации галантамина и метформина положительно влияет на двигательную активность и продолжительность жизни с сохранением здоровья.

Однократная обработка *C. elegans* отдельными соединениями (Gal и Met) значительно увеличивала параметры множественной двигательной активности в половозрелом возрасте (фиг. 3). Например, Gal значительно увеличивал исходную максимальную активность на 15% ( $P_{ANOVA}=0,0054$ ), в то время как Met увеличивал исходную максимальную активность на 35% ( $P_{ANOVA}<0,0001$ ) по сравнению с необработанным контролем. Комбинация Gal и Met вызывала наибольшее процентное увеличение исходной максимальной активности: 41% по сравнению с необработанным контролем ( $P_{ANOVA}<0,0001$ ). Более того, для большинства параметров двигательной активности значительно улучшенный эффект наблюдали у животных, обработанных комбинацией Met и Gal, по сравнению по меньшей мере с одной обработкой одним соединением (фиг. 3). Ни одно из отдельных соединений не вызывало значительно лучшего эффекта, чем комбинация Gal и Met, что указывает на повышенную эффективность при комбинировании как Gal, так и Met.

По сравнению с необработанным контролем комбинация Gal и Met увеличивала общее количество дней жизни с сохранением здоровья (т.е. продолжительность жизни с сохранением здоровья, основанную

на двигательной активности) на 30%, что было значительно лучше, чем эффект, наблюдаемый для Met (+14%,  $P_{ANOVA}=0,037$ ), но значительно не отличается от эффекта, наблюдаемого для Gal (+20%,  $P_{ANOVA}=0,095$ ) (фиг. 3С). Таким образом, двигательная активность во время старения, а также продолжительность жизни с сохранением здоровья, основанная на двигательной активности (т.е. период жизни, когда животное демонстрирует нормальные уровни мышечной функции), значительно усиливаются у животных, обработанных комбинацией Met и Gal.

Многочисленное введение *C. elegans* комбинации галантамина и метформина положительно влияет на двигательную активность и поведенческие параметры синергетическим образом.

Для получения большей информации о влиянии на продолжительность жизни с сохранением здоровья, основанную на двигательной активности, авторы настоящего изобретения количественно оценивали четыре параметра двигательной активности и поведения у половозрелых особей пострепродуктивного возраста *C. elegans* после многократного введения Gal, Met и комбинации. Наивысшие уровни по всем четырем параметрам (т.е. сходные с фенотипами двигательной активности у более молодых особей) наблюдали у животных, обработанных комбинацией 25 мМ Met и 100 мкМ Gal (табл. 2, фиг. 4). У животных, обработанных этой комбинацией Met и Gal, средняя скорость передвижения увеличивалась на 141% ( $p<0,000001$ ), максимальная скорость на 24% ( $p<0,001$ ), доля времени, потраченного на перемещение, на 46% ( $p<0,000001$ ) и занятость клеток на 239% ( $p<0,000001$ ) по сравнению с необработанным контролем. По сути, связанное с возрастными заболеваниями снижение этих четырех параметров, основанных на двигательной активности, значительно ослабляется с помощью комбинации Met и Gal. Более того, значительный синергетический эффект между Met и Gal наблюдали для параметров "средняя скорость передвижения" и "занятость клеток" по сравнению с обработками одним соединением (табл. 2, фиг. 4). В целом результаты, полученные авторами настоящего изобретения, показывают, что комбинация Met и Gal способна улучшить продолжительность жизни с сохранением здоровья, основанной на двигательной активности, больше, чем Met или Gal по отдельности.

Затем для оценки широты стратегии смешивания соединений авторы настоящего изобретения анализировали двигательную активность животных *C. elegans*, обработанных другими представителями группы ингибиторов ацетилхолинэстеразы (всегда в комбинации с Met). Комбинация 25 мМ Met с другими ингибиторами ацетилхолинэстеразы (т.е. Don и Riv) или соединениями, подобными ингибитору ацетилхолинэстеразы (т.е. Mem), индуцировала подобный фенотип двигательной активности, как и комбинация 25 мМ Met с ингибитором ацетилхолинэстеразы Gal (фиг. 5, табл. 3). При рассмотрении всех четырех исследуемых условий (табл. 3) по сути отсутствовала значительная разница между обработками соединения ( $P_{ANOVA}=0,25$ ). Из 16 выполненных статистических сравнений (т.е. нескольких тестов на t-критериев) только одно было значимым: когда Mem комбинировали с Met, максимальная скорость передвижения снижалась (-14,5%;  $p=0,0036$ ) по сравнению с условием, в котором Met комбинировали с Gal (табл. 3). Тем не менее все 15 других статистических сравнений параметров двигательной активности и поведения не оказались значимо различающимися (фиг. 5). Следовательно, в комбинации с Met все исследуемые ингибиторы ацетилхолинэстеразы, по-видимому, действуют аналогичным образом.

Табл. 2 демонстрирует, что двигательная активность половозрелых особей *C. elegans* среднего возраста (т.е. половозрелых особей через 7 дней после наступления репродуктивного возраста) значительно усиливается после многократного введения Gal и Met, а также их комбинации. Показаны объединенные данные нескольких повторностей. Значимые синергетические эффекты между Gal и Met (в соответствии с определением модели HSA) выделены жирным шрифтом. Значимость (относительно необработанного контрольного состояния) обозначается посредством следующего: NS - не значимый, \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ ,  $p<0,001$ . N - общее количество исследованных животных, SEM - стандартная ошибка среднего, № - количество выполненных повторных анализов. Доля времени, занятого перемещением, представляет собой долю времени, в течение которого животное бегало (в отличие от паузы или поворота). Занятость клеток обозначает количество уникальных клеток (квадраты 1 мм<sup>2</sup>), которые червь посетил в течение периода визуализации. Данные соответствуют фиг. 4.

Таблица 2

| Анализы                              | Состояние          | [Gal]<br>(мкМ) | [Met]<br>(мМ) | Средняя<br>скорость<br>(мкм/с)±<br>SEM | Максимальная<br>скорость<br>(мкм/с)±<br>SEM | Доля<br>времени,<br>занятого<br>перемещением<br>(%)±<br>SEM | Занятость<br>клеток<br>(уникальные<br>посещенные<br>участки)<br>±SEM | N № |
|--------------------------------------|--------------------|----------------|---------------|--|---|---|--|-----|
| <i>Met + Gal</i>                     |                    |                |               |  |   |   |  |     |
|                                      | Необработанный     | 0              | 0             | 50 ± 3                                 | 242 ± 13                                    | 48 ± 2  | 11 ± 1   | 6 3 |
|                                      | Gal, 100           |                |               |  |   |   |  | 0   |
|                                      | Met, 25            | 100            | 0             | 48 ± 4 <sup>NS</sup>                   | 270 ± 17 <sup>NS</sup>                      | 48 ± 2 <sup>NS</sup>  | 11 ± 1 <sup>NS</sup>   | 8 4 |
|                                      | Met, 25 + Gal, 100 |                |               |  |   |   |  | 0   |
|                                      |                    | 0              | 25            | 102 ± 5 <sup>***</sup>                 | 262 ± 8 <sup>NS</sup>                       | 67 ± 2 <sup>***</sup>                                       | 28 ± 3 <sup>***</sup>  | 6 3 |
|                                      |                    |                |               |  |   |   |  | 0   |
|                                      |                    | 100            | 25            | 120 ± 6 <sup>***</sup>                 | 299 ± 8 <sup>***</sup>                      | 70 ± 2 <sup>***</sup>                                       | 37 ± 3 <sup>***</sup>  | 6 3 |
|                                      |                    |                |               |  |   |   |  | 0   |
| Значим ли синергизм между Gal и Met? |                    |                |               |  |   |   |  |     |
|                                      |                    |                |               | Да                                     | Нет   | Нет   | Да   |     |
|                                      |                    |                |               |  |   |   |  |     |
|                                      |                    |                |               | $p < 1E-6$                             | $p = 0,14$                                  | $p < 1E-6$  | $p < 1E-6$   |     |
|                                      |                    |                |               | $p = 0,046$                            | $p = 0,0092$                                | $p = 0,17$  | $p = 0,037$  |     |
|                                      |                    |                |               |  |   |   |  |     |
|                                      |                    |                |               |  |   |   |  |     |

Табл. 3 демонстрирует, что комбинирование Met с различными ингибиторами ацетилхолинэстеразы (например, Don, Riv и Gal) или соединениями, подобными ингибиторам ацетилхолинэстеразы (например, Met), приводит к подобным фенотипам двигательной активности. Значимость (по сравнению с условием Met 25+Gal 100) обозначается посредством следующего: <sup>NS</sup> - не значимый,  $p < 0,05$ . Двигательную активность количественно оценивали на 7-й день половозрелого возраста подобно данным, представленным в табл. 2. Показаны объединенные данные нескольких повторностей. N - общее количество исследованных животных, SEM - стандартная ошибка среднего, № - количество выполненных повторных анализов. Конечные концентрации Gal (100 мкМ), Don (80,92 мкМ), Riv (57,12 мкМ) и Met (132,2 мкМ) основаны на их максимальных суточных клинических дозах. Данные соответствуют фиг. 5.

Таблица 3

| Анализы                  | Состояние          | Средняя скорость      | Максимальная скорость  | Доля времени, занятого перемещением | Занятость клеток                      | №    |
|--------------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|------|
|                          |                    | (мкм/с) ± SEM         | (мкм/с) ± SEM          | (%) ± SEM                           | (уникальные посещенные участки) ± SEM |      |
| <i>Met (мМ) + другой</i> |                    |                       |                        |                                     |                                       |      |
| <i>AChEI (мкМ)</i>       |                    |                       |                        |                                     |                                       |      |
|                          | Met, 25 + Gal, 100 | 126 ± 5               | 375 ± 10               | 69 ± 1                              | 29 ± 2                                | 80 4 |
|                          | Met 25 + Don 80,9  | 127 ± 6 <sup>NS</sup> | 374 ± 11 <sup>NS</sup> | 65 ± 1 <sup>NS</sup>                | 31 ± 3 <sup>NS</sup>                  | 60 3 |
|                          | Met 25 + Riv 57,1  | 126 ± 2               | 342 ± 9 <sup>NS</sup>  | 69 ± 2 <sup>NS</sup>                | 25 ± 2 <sup>NS</sup>                  | 60 3 |
|                          | Met 25 + Mem       | 116 ± 9               | 321 ± 13 *             | 64 ± 2 <sup>NS</sup>                | 30 ± 3 <sup>NS</sup>                  | 60 3 |
|                          | 132,2              |                       |                        |                                     |                                       |      |

Транскрипция глутатион-S-трансферазы 4 усиливается за счет Gal и Met синергетическим образом. Авторы настоящего изобретения анализировали уровни транскрипции глутатион-S-трансферазы 4 (*gst-4*) синхронизированных по возрасту популяций *C. elegans* после обработки лекарственными средствами. Как и ожидалось, исходя из литературных данных [14], обработанные Met животные демонстрировали значимые более высокие уровни транскрипции *gst-4* (+26%,  $P_{ANOVA} < 0,0001$ , фиг. 6) по сравнению с необработанным контролем. Обработка только 100 мкМ Gal не вызывала значительного увеличения транскрипции *gst-4* (+9%,  $P_{ANOVA} = 0,37$ ). Тем не менее комбинация 25 мМ Met и 100 мкМ Gal индуцировала самую сильную активацию транскрипции *gst-4*. Флуоресцентный сигнал увеличился на 62% по сравнению со 100 мкМ Gal ( $P_{ANOVA} < 0,0001$ ) и на 28% по сравнению с обработкой только 25 мМ Met ( $P_{ANOVA} < 0,0001$ ). Следовательно, авторы настоящего изобретения обнаружили, что Gal и Met действуют синергетически с активацией транскрипции *gst-4*. Этот эффект был весьма стабильным и его четко наблюдали в дополнительных независимых анализах как в присутствии, так и в отсутствие окислительного стресса (данные не показаны). Активация *gst-4* указывает на усиленную защиту от окислительного стресса и ксенобиотиков (детоксикацию), а также на активацию факторов транскрипции Nrf2/SKN-1 и/или PLZF/EOR-1, способствующих долголетию. Как отмечалось ранее, повышенная регуляция ферментов GST связана с продолжительностью жизни у многих видов (включая человека) и является общим признаком долгоживущих *C. elegans*. Следовательно, синергетическая активация *gst-4* согласуется с предыдущими наблюдениями синергетического эффекта между Gal и Met в отношении долголетия. Таким образом, поскольку активация *gst-4* защищает от окислительного стресса, авторами настоящего изобретения будет исследовано влияние комбинации Gal и Met на стрессоустойчивость к тепловому и окислительному стрессу с применением автоматизированного способа оценки выживаемости без использования меток (FLASS), способа для автоматизации анализов на выживаемость, в котором применяется ассоциированная со смертью флуоресценция для определения среднего времени наступления смерти, как описано ранее [15].

Морфология мышц *C. elegans* улучшается за счет комбинации Gal и Met *C. elegans*, обработанные комбинацией Gal и Met, демонстрировали количественные и качественные улучшения морфологии мышц в позднем половозрелом возрасте по сравнению с животными необработанного контрольного состояния (фиг. 7A, 7B). По сравнению с необработанным контролем *C. elegans*, обработанные комбинацией из 25 мМ Met и 100 мкМ Gal, имели значительно увеличенное соотношение сторон саркомера (+7,7%,  $p = 0,045$ , фиг. 7A). По сути общий размер их саркомеров (т.е. соотношение сторон) подобен размеру у более молодых индивидуумов. Обработка только 25 мМ Met или исключительно 100 мкМ Gal не вызвала значительного увеличения соотношения сторон (фиг. 7A).

Другим морфологическим показателем мышц, который определяли количественно, была гладкость контура миофиламентов. По сравнению с необработанным контрольным условием авторы настоящего

изобретения наблюдали увеличение гладкости контура миофиламентов на 55% у животных, обработанных комбинацией 25 мМ Met и 100 мкМ Gal (фиг. 7B). И все же, наблюдали только тенденцию ( $p=0,076$ ), предположительно вследствие более высокой биологической изменчивости этого параметра. Тем не менее на иллюстративных полученных с помощью микроскопа изображениях было отмечено, что миофиламенты в саркомерах животных, обработанных комбинацией Gal и Met, имеют более правильную форму и ориентацию, чем у необработанных животных. Более конкретно, миофиламенты животных, обработанных комбинацией Gal и Met, характеризовались тенденцией к параллельной симметричной организации, в отличие от необработанных животных, миофиламенты которых характеризовались тенденцией к несколько более неправильной форме и ориентации. Это свидетельствует об улучшенной мышечной функции у животных, обработанных комбинацией Gal и Met, что согласуется с предыдущими наблюдениями авторов настоящего изобретения, касающимися увеличенной скорости передвижения у этих животных (см. выше).

Пример 2. Мышиная модель.

Введение.

На основании доказательств того, что компоненты метформина и галантамин нацелены на известные пути, вовлеченные в старение и дряблость, авторы настоящего изобретения провели исследование влияния данной комбинации на саркопению и мышечную силу на мышинной модели с экспрессией мышечно-специфического белка, ассоциированного с атрофией зрительного нерва 1 типа (OPA1), а также на общее изменение параметров старения. Эта модель трансгенных мышей эффективно воспроизводит ключевые патофизиологические аспекты связанной с саркопенией потери мышечной массы и силы, и демонстрирует преждевременное старение (например, седые волосы, кифоз) [16]. Деления OPA1, в частности в скелетных мышцах, приводит к нарушению функции митохондрий, усилению окислительного стресса и воспалению.

Материал и способы.

Мышиная модель OPA1.

Получение и определение характеристик мышей Opa1<sup>-/-</sup> подробно описаны в другом разделе данного документа [16, 17]. Индуцибельную мышечно-специфическую делению OPA1 получали путем скрещивания линии Opa1<sup>fl/fl</sup> с мышами, несущими Cre-ER, управляемый промотором скелетного актина человека (HSA). Индуцированную тамоксифеном рекомбинацию CreLoxP активировали путем перорального введения тамоксифеносодержащего корма (Tam400/Cre ER Harlan), который предоставляли ad libitum в течение 5 недель. Животные с приемом пищи получали предположительно по 1 мг тамоксифена в сутки. Эксперименты проводили как на самках, так и на самцах мышей.

Корма.

Мышей с мышечно-специфическим нокаутом OPA1 содержали на домашнем корме (стандартный сертификат качества корма от Mucedola S.R.L.) или домашним кормом с добавлением метформина и галантамина. Комбинацию составляли для обеспечения суточных доз 2,5 мг галантамина и 410 мг метформина на кг<sup>-1</sup> массы тела. Используемые в исследовании корма приобретали у Mucedola S.R.L.

Доклинические исследования композиционного состава тела и энергетического баланса.

Изменения в композиционном составе тела происходят на протяжении всей жизни человека. В целом раннее старение ассоциировано с постепенно увеличивающейся массой жировой ткани и снижением мышечной массы тела и минеральной плотности костей, тогда как на более поздних стадиях жизни люди начинают терять вес, в частности жировые отложения.

Масса тела и композиционный состав тела.

Массу тела контролировали еженедельно или один раз в две недели. Измерения мышечной массы и массы жировой ткани у живых мышей оценивали с помощью EchoMRI-100 (EchoMRI, Хьюстон, Техас, США).

Оценка метаболизма.

Скорость метаболизма мышей оценивали с помощью непрямой калориметрии с применением системы метаболических клеток PhenoMaster (TSE, Берлин, Германия), которая предусматривала прямые измерения потребления кислорода (VO<sub>2</sub>) и образования углекислого газа (VCO<sub>2</sub>). На основании этих параметров рассчитывали расход энергии [18]. Вместе с тем контролировали потребление пищи.

Доклинические исследования нервно-мышечного функционирования и производительности.

Нервно-мышечное функционирование и производительность являются ключевыми клиническими результатами при оценке общего состояния здоровья пожилых людей, поскольку они тесно связаны с неблагоприятными явлениями в отношении здоровья, такими как ослабление организма, депрессия, ограничение физических возможностей и смерть.

Физические характеристики.

Снижение функциональных показателей среди людей пожилого возраста, зачастую ассоциированное со снижением моторных и когнитивных способностей, а также значительной заболеваемостью, считается ключевым фактором, определяющим состояние здоровья людей более старшего возраста. На мышах разрабатывали серию исследований для оценки поведенческих результатов у мышей в период старения.

Беговая дорожка. Протокол тренировки в концентрическом режиме состоял из бега на беговой дорожке (Biological Instruments, LE 8710 Panlab Technology 2B) до изнеможения при постоянной величине наклона 5° со скоростью 13 см/с. Общее время бега регистрировали для каждой мыши.

Сила захвата. Силу захвата оценивали, позволяя мышам ухватиться за сетку, а затем, потянув мышью за хвост, записывали при этом время до отпущения мышами сетки.

Измерения силы *in vivo* проводили на живых животных с применением системы мышечного рычага 305B (Auroga Scientific, Онтарио, Канада), как описано ранее [19]. Вкратце протокол "сила-частота" состоял из серии стимуляций с возрастающей частотой (одиночный импульс, 20, 40, 55, 75, 100 и 150 Гц). Каждую стимуляцию выполняли через >30 с после последней, приложенное напряжение находилось в диапазоне от 4 до 6 В, продолжительность каждой тренировки устанавливали на 200 мс, а длительность каждого одиночного импульса устанавливали на 200 мкс.

Забор мышечной ткани, печени и белой жировой ткани.

Через 67 дней после индукции мышей умерщвляли и собирали мышцы (икроножную, переднюю большеберцовую, камбаловидную) с помощью стандартных способов расчленения. Мышечные ткани очищали от лишнего жира и соединительной ткани, взвешивали на аналитических весах и собирали для дальнейшего анализа. Мышечную ткань сохраняли для гистологического анализа и анализа РНК. Собирали печень и сохраняли для гистологического анализа. Собирали белую жировую ткань и взвешивали на аналитических весах.

Экспрессия генов.

Общую РНК выделяли из мышц с помощью TRIzol (Invitrogen). Комплементарную ДНК получали с использованием обратной транскриптазы Superscript III (Invitrogen). Экспрессию генов определяли с помощью qPCR, как описано [16].

Количественную ПЦР проводили со следующими праймерами:

IL6Fw: TAGTCCTCCTACCCCAATTTCC;

IL6Rv: TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC;

GAPDHFw: CACCATCTCCAGGAGCGAG;

GAPDHRv: CCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC.

Гистологический и иммунофлуоресцентный анализ.

Криосрезы икроножных мышц и печени окрашивали сукцинатдегидрогеназой (SDH) и масляным красным O соответственно. Общее количество миофибрилл икроножной мышцы рассчитывали, исходя из всего поперечного сечения задней конечности на основании собранного мозаичного изображения (20×увеличение). Для иммунологического окрашивания использовали антитело к NCAM (разведение 1:200 в блокирующем буфере, Millipore, Сент-Луис, Миссури). WGA, конъюгированный с Cy3, использовали для идентификации сарколеммы. Изображения получали с помощью цифровой камеры, представляющей собой прибор с зарядовой связью, Leica DFC300-FX и программного обеспечения Leica DC Viewer.

Статистические методы и определение синергизма.

Все данные представлены как среднее значение  $\pm$ SEM. Сравнение между 2 группами проводили с помощью двухсторонних t-критериев Стьюдента. Для статистического анализа групповых различий авторы настоящего изобретения проводили однофакторный ANOVA с соответствующей поправкой на множественные сравнения (критерии множественных сравнений Тьюки, программное обеспечение GraphPad Prism). Повторные измерения ANOVA применяли для оценки значимых изменений в динамике по времени между двумя (или более) группами. P-значения менее 0,05 считали значимыми.

Результаты.

У мышей <sup>-/-</sup> по экспрессии мышечно-специфического *Orp1*, обработанных комбинацией метформина и галантамина, поддерживалась масса жировой ткани, восстанавливался метаболизм и был предупрежден стеатоз печени.

Обработка комбинацией метформина и галантамина не влияла на массу тела (фиг. 8A) и мышечную массу (фиг. 8B) у самок мышей *Orp1*<sup>-/-</sup>. Однако с возрастом масса жировой ткани сохранялась у обработанных самок мышей *Orp1*<sup>-/-</sup> (фиг. 8C), что было ассоциировано с повышенной выживаемостью в исследованиях на грызунах и человеке [20, 21, 22]. Параллельно с этим у обработанных самцов мышей *Orp1*<sup>-/-</sup> обеспечивалось частичное предупреждение потери белой жировой ткани (фиг. 8D). Несмотря на то что обработанные самки мышей *Orp1*<sup>-/-</sup> имели увеличенную массу жировой ткани по сравнению с необработанными мышами *Orp1*<sup>-/-</sup>, эта группа потребляла такое же количество калорий (фиг. 8E). Затем исследовали взаимосвязь между массой тела и скоростью метаболизма путем оценки метаболизма *in vivo* с применением системы метаболических клеток PhenoMaster. Непрямая калориметрия показала, что комбинация галантамина и метформина нормализовала потребление кислорода и образование углекислого газа, особенно во время световой фазы, у самок мышей *Orp1*<sup>-/-</sup> относительно контрольных мышей (фиг. 8F, 8G). Параллельно с этим у обработанных самок мышей *Orp1*<sup>-/-</sup> был увеличенный расход энергии по сравнению с необработанными мышами *Orp1*<sup>-/-</sup> несмотря на увеличенную массу жировой ткани (фиг. 8H).

Следовательно, увеличенную массу жировой ткани, наблюдаемую у обработанных мышей  $Orp1^{-/-}$ , нельзя объяснить потреблением пищи или расходом энергии. Эти данные свидетельствуют о том, что комбинированное лечение галантамином и метформинном корректирует фенотип чрезмерного голода, наблюдаемый у необработанных мышей  $Orp1^{-/-}$ . Затем для оценки стеатоза печени у этих мышей авторы настоящего изобретения проводили окрашивание масляным красным O. Необработанные самки мышей  $Orp1^{-/-}$  демонстрировали стеатоз печени, который полностью предупреждали у обработанных мышей  $Orp1^{-/-}$ . Уровни мышечной экспрессии IL6 у обработанных самок мышей  $Orp1^{-/-}$  нормализовали до контрольных уровней, что свидетельствует о уменьшении степени воспаления (фиг. 8I).

Комбинация метформина и галантамина обеспечивала улучшение физических характеристик у мышей  $^{-/-}$  по экспрессии мышечно-специфического  $Orp1$ .

Затем авторы настоящего изобретения определяли, сохраняются ли физические характеристики, важный маркер продолжительности жизни с сохранением здоровья, у обработанных мышей  $Orp1^{-/-}$ . Чтобы определить состояние физического здоровья этих животных, авторы настоящего изобретения включили измерения на беговой дорожке, силы захвата и силы. Обработанные самки мышей  $Orp1^{-/-}$  бегали в три раза дольше, чем необработанные мыши  $Orp1^{-/-}$  (фиг. 9A). Кроме того, значимый эффект комбинированной обработки наблюдали в отношении силы захвата (фиг. 9B). Обработка показала увеличение абсолютной силы (фиг. 9C) и максимальной удельной силы (фиг. 9E), создаваемой во время судороги, у обработанных самок мышей  $Orp1^{-/-}$ , но этот эффект не был значимым. Отсутствие значимости у самок, вероятно, является результатом недостаточного количества и большей биологической изменчивости. Однако у обработанных самцов мышей  $Orp1^{-/-}$  наблюдали значительное увеличение абсолютной силы и максимальной удельной силы по сравнению с необработанными мышцами  $Orp1^{-/-}$  (фиг. 9D-9F), что указывает на снижение степени мышечной слабости у обработанных мышей  $Orp1^{-/-}$ . В целом данные исследования указывают на то, что комбинация галантамина и метформина улучшила общее физическое состояние мышей  $Orp1^{-/-}$ , что ассоциировано с более низкими показателями смертности по любой причине и в результате сердечно-сосудистых заболеваний [23].

Комбинация метформина и галантамина частично обеспечивала сохранение мышечной массы у мышей  $Orp1^{-/-}$ .

Мышцы как необработанных, так и обработанных мышей  $Orp1^{-/-}$  были меньшими по сравнению с контрольными мышцами, как у самок (фиг. 10A-10C), так и у самцов (фиг. 10D-10F). У самок передняя большеберцовая мышца, гликолитическое волокно II типа (быстро сокращающееся), частично сохранялась у обработанных мышей  $Orp1^{-/-}$  (фиг. 10A), тогда как у самцов икроножная и камбаловидная мышца частично восстанавливались у обработанных мышей  $Orp1^{-/-}$  (фиг. 10E). Это важное открытие, поскольку связанная с возрастными заболеваниями атрофия мышц больше в мышцах гликолитического типа (передняя большеберцовая мышца, икроножная мышца) по сравнению с мышцами окислительного типа (например, камбаловидная мышца). Окрашивание сукцинатдегидрогеназой (SDH) было увеличено у необработанных самок мышей  $Orp1^{-/-}$  по сравнению с контрольными и необработанными животными  $Orp1^{-/-}$ , что свидетельствует об усиленном окислительном метаболизме. Однако области цитоплазмы миофибрилл ПА типа были лишены митохондрий у необработанных мышей  $Orp1^{-/-}$  (данные гистопатологического исследования в файле), паттерна локализации, напоминающего заболевание центрального стержня, и это сохранялось у обработанных мышей  $Orp1^{-/-}$ . В соответствии с окрашиванием SDH у необработанных животных  $Orp1^{-/-}$  наблюдали увеличенное количество волокон ПА типа по сравнению с контрольными и обработанными мышцами  $Orp1^{-/-}$  (фиг. 10G). Затем авторы настоящего изобретения исследовали экспрессию молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), молекулы, которая обогащена постсинаптической мембраной нервно-мышечного соединения (NMJ), но в основном отсутствует в миофибриллах половозрелых особей. Однако после утраты иннервации NCAM повторно экспрессируется по всему мышечному волокну. Важно отметить, что утрату иннервации миофибрилл, которая происходит в ходе нормального старения и которая совпадает с ускорением мышечной атрофии, частично предупреждали у обработанных самок мышей  $Orp1^{-/-}$ , о чем свидетельствует уменьшенное количество NCAM-положительных волокон (фиг. 10H). Кроме того, у этих мышей также будут оценивать состояние костей. Некоторые параметры (например, объем трабекулярного вещества, показатель степени соединенности трабекулярного вещества, минеральную плотность трабекулярного вещества и толщину кортикального слоя) будут оценивать с помощью микро-КТ.

Далее мышей  $Orp1^{-/-}$  будут обрабатывать отдельными компонентами галантамином и метформинном по отдельности и будут проводить такой же анализ, как описано выше.

Комбинация метформина и галантамина в отношении продолжительных физиологических, метаболических и функциональных показателей динамики состояния здоровья.

Влияние комбинированного лекарственного средства (метформин и галантамин) на физиологические, метаболические и функциональные показатели динамики состояния здоровья будут измерять у двух линий мышей и обоих полов на протяжении всей их жизни, что называется исследованием продолжительного старения у мышей 2 (SLAM-2). Схема данного исследования основана на исследовании SLAM-1 в Национальном институте по проблемам старения (НИИ, США), в котором проводили исследования в отношении тех же старения и возрастных фенотипов, но без вмешательства. SLAM-2 будет пред-

ставлять собой очень обширное исследование с началом проведения измерений у мышей в возрасте 12 месяцев. В разных конечных точках на протяжении всей жизни будут проводить различные исследования с акцентом в основном на четыре ключевых фенотипа старения: метаболический (например, диабет, NAFLD, метаболический синдром), нервно-мышечный (например, саркопения, остеопороз, стабильность NMJ), сердечно-сосудистый (например, сердечная недостаточность) и когнитивный (например, болезнь Альцгеймера), которые имеют большое значение для здоровья человека, поскольку эти области являются основной причиной ограничения физических возможностей, смертности и заболеваемости. Результаты SLAM-2 покажут, как изменяется динамика биологических и физиологических параметров при соединении, которое, как известно, оказывает положительное влияние на старение с сохранением здоровья по сравнению с результатами SLAM-1 исходного уровня.

Более того, в отдельном исследовании будет изучена эффективность в отношении продолжительности жизни с сохранением здоровья и продолжительности жизни как отдельных соединений, так и комбинированного лекарственного средства. Серию исследований, подобных тем, которые описаны в SLAM-2, будут выполнять продолжительно с равными интервалами, еженедельно и ежемесячно, на протяжении всей жизни животных.

Комбинация метформина и галантамина для обеспечения повышенной устойчивости.

Параллельно с исследованиями без подверженности стрессу эффекты комбинации метформина и галантамина будут изучены в контексте моделей стресса (устойчивости). Тремя наиболее распространенными клиническими заболеваниями, ассоциированными со старением человека, являются связанный с ожирением диабет II типа (вызванный перекармливанием), саркопения (длительный постельный режим) и нестабильность нервно-мышечного соединения (травма, хирургическое вмешательство). Тремя хорошо зарекомендовавшими себя и эффективными по времени мышечными моделями, которые можно применять для изучения таких осложнений с помощью +/- комбинации метформина и галантамина, являются

(I) мыши, которым скармливают рацион с высоким содержанием жиров (HFD);

(II) подвешивание за задние конечности; и

(III) ущемление или разрезание седалищного нерва соответственно.

В контексте этих моделей будет проведена панель стандартизированных кратковременных исследований на мышах молодого и среднего возраста, чтобы определить эффективность комбинации метформина и галантамина в отношении обеспечения повышенной устойчивости.

Пример 3. Исследование на человеке.

А. Исследование для подтверждения концепции на примере пациентов с саркопеническим ожирением.

Данное поисковое исследование для подтверждения концепции будет проведено для оценки того, насколько благоприятным является влияние комбинации метформина и галантамина на саркопенические параметры мышечной массы и мышечной силы у пациентов с саркопеническим ожирением. Оно также предназначено для оценки влияния различных доз метформина и галантамина на параметры, подлежащие оценке, в том числе биомаркеры старения. Данное исследование представляет собой рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование для подтверждения концепции, продолжительностью 24 недели, состоящее из 3 последовательных 8-недельных периодов лечения с 3 возрастающими уровнями доз.

Метформин будет предоставлен в виде состава с немедленным высвобождением, замедленным высвобождением, отсроченным высвобождением или контролируемым высвобождением, что позволит обеспечить суточные дозы в 250 мг (уровень дозы 1), 500 мг (уровень дозы 2) и 1000 мг (уровень дозы 3). Галантамин будет предоставлен в виде состава с немедленным высвобождением или замедленным высвобождением, что позволит обеспечить суточные дозы в 3 мг (уровень дозы 1), 6 мг (уровень дозы 2) и 12 мг (уровень дозы 3). Комбинация метформина и галантамина будет предоставлена в виде фиксированной комбинации, например, 250 мг метформина и 3 мг галантамина (уровень дозы 1), 500 мг метформина и 6 мг галантамина (уровень дозы 2) и 1000 мг метформина и 12 мг галантамина (уровень дозы 3). Будут предоставлены соответствующие составы плацебо.

В. Исследование для подтверждения концепции у пациентов с саркопенией, перенесших полную артропластику тазобедренного сустава.

Данное поисковое исследование для подтверждения концепции разработано для оценки того, насколько благоприятным является влияние комбинации метформина и галантамина на саркопенические параметры мышечной массы и мышечной силы у пациентов с саркопенией, которым запланирована полная артропластика тазобедренного сустава (ТНА) бедра. Оно также предназначено для оценки того, испытывают ли пациенты, получавшие комбинацию метформина и галантамина, лучший функциональный результат после ТНА, и в какой степени. Данное исследование представляет собой рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое поисковое исследование для подтверждения концепции, продолжительностью 24 недели, состоящее из 12-недельной фазы лечения до операции и 12-недельной фазы лечения после операции.

Комбинация метформина и галантамина будет предоставлена в виде фиксированной комбинации, например, 250 мг метформина и 3 мг галантамина (уровень дозы 1), 500 мг метформина и 6 мг галанта-

мина (уровень дозы 2) и 1000 мг метформина и 12 мг галантамина (уровень дозы 3). Будут предоставлены соответствующие составы плацебо. Лечение проводится частично до операции и частично после операции.

Литературные источники.

1. De Haes, W. et al. Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX-2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E2501–E2509 (2014).
2. Wilkinson, D. S., Taylor, R. C. & Dillin, A. Analysis of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Cell Biol.* 107, 353–381 (2012).
3. Churgin, M. A. et al. Longitudinal imaging of *Caenorhabditis elegans* in a microfabricated device reveals variation in behavioral decline during aging. *Elife* 6, (2017).
4. Lucanic, M. et al. Standardized Protocols from the *Caenorhabditis* Intervention Testing Program 2013-2016: Conditions and Assays used for Quantifying the Development, Fertility and Lifespan of Hermaphroditic *Caenorhabditis* Strains. *Protoc. Exch.* (2017).
5. Keith, S. A., Amrit, F. R. G., Ratnappan, R. & Ghazi, A. The *C. elegans* healthspan and stress-resistance assay toolkit. *Methods* 68, 476–486 (2014).
6. Hahm, J.-H. et al. *C. elegans* maximum velocity correlates with healthspan and is maintained in worms with an insulin receptor mutation. *Nat. Commun.* 6, 8919 (2015).
7. Hsu, A.-L., Feng, Z., Hsieh, M.-Y. & Xu, X. Z. S. Identification by machine vision of the rate of motor activity decline as a lifespan predictor in *C. elegans*. *Neurobiol. Aging* 30, 1498–1503 (2009).
8. Peymen, K. et al. Myoinhibitory peptide signaling modulates aversive gustatory learning in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Genet.* 15, e1007945 (2019).
9. Dues, D. J. et al. Aging causes decreased resistance to multiple stresses and a failure to activate specific stress response pathways. *Aging (Albany, NY)*. 8, 777–795 (2016).
10. McElwee, J. J. et al. Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. *Genome Biol.* 8, R132 (2007).
11. Detienne, G., Van de Walle, P., De Haes, W., Schoofs, L. & Temmerman, L. SKN-1-independent transcriptional activation of glutathione S-transferase 4 (GST-4) by EGF signaling. *Worm* 5, e1230585 (2016).
12. Herndon, L. A. et al. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. Elegans*. *Nature* (2002).
13. Borisy, A. A. et al. Systematic discovery of multicomponent therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 7977–7982 (2003).

14. Cabreiro, F. et al. Metformin Retards Aging in *C. elegans* by Altering Microbial Folate and Methionine Metabolism. *Cell* 153, 228–239 (2013).
15. Benedetto, A. et al. LFASS: Label-free automated survival scoring for high-throughput nematode assays. *Aging Cell* in press (2019).
16. Tezze, C. et al. Age-Associated Loss of OPA1 in Muscle Impacts Muscle Mass, Metabolic Homeostasis, Systemic Inflammation, and Epithelial Senescence. *Cell Metab.* 25, 1374-1389.e6 (2017).
17. Cogliati, S. et al. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* 155, 160–171 (2013).
18. Weir, J. B. de V. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J. Physiol.* 109, 1–9 (1949).
19. Blaauw, B. et al. Akt activation prevents the force drop induced by eccentric contractions in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3686–3696 (2008).
20. Mitchell, S. J. et al. Effects of Sex, Strain, and Energy Intake on Hallmarks of Aging in Mice. *Cell Metab.* 23, 1093–1112 (2016).
21. Liao, C. Y. et al. Fat maintenance is a predictor of the murine lifespan response to dietary restriction. *Aging Cell* 10, 629–639 (2011).
22. Flegal KM, Kit BK, Orpana H, G. B. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories. *J. Am. Med. Assoc.* 97, 3855–63 (2013).
23. Kokkinos, P. Physical Activity, Health Benefits, and Mortality Risk. *ISRN Cardiol.* 2012, 1–14 (2012).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение фармацевтической комбинации для лечения, предупреждения и/или уменьшения симптомов возрастных и/или дегенеративных заболеваний у субъекта,

при этом указанная фармацевтическая комбинация содержит метформин и галантамин;

при этом возрастные и/или дегенеративные заболевания представляют собой заболевания нервно-скелетно-мышечной системы, дряблость и воспалительное заболевание печени.

2. Применение по п.1, где указанные заболевания представляют собой заболевания нервно-скелетно-мышечной системы и/или дряблость.

3. Применение по любому из предыдущих пунктов, где возрастные и/или дегенеративные заболевания нервно-скелетно-мышечной системы выбраны из группы, включающей экстрапирамидные и двигательные нарушения, заболевания нервно-мышечного соединения и мышц, системные атрофии, поражающие в первую очередь центральную нервную систему, мышечную дистрофию, мышечную дистрофию Дюшенна, спинальную мышечную атрофию и сопутствующие заболевания, заболевания двигательных нейронов, такие как амиотрофический латеральный склероз, аномальные произвольные движения, аномалии походки и подвижности, атаксию, ассоциированные с митохондриями нервно-скелетно-мышечные заболевания и саркопению.

4. Применение по любому из предыдущих пунктов, где возрастные и/или дегенеративные заболевания нервно-скелетно-мышечной системы представляют собой экстрапирамидные и двигательные нарушения, заболевания нервно-мышечного соединения и мышц, системные атрофии, поражающие в первую очередь центральную нервную систему, мышечную дистрофию, мышечную дистрофию Дюшенна, спинальную мышечную атрофию и сопутствующие заболевания, заболевания двигательных нейронов, такие как амиотрофический латеральный склероз, аномальные произвольные движения, аномалии походки и подвижности или атаксию.

5. Применение по любому из пп.1-4, где возрастное и/или дегенеративное заболевание нервно-скелетно-мышечной системы представляет собой саркопению.

6. Применение по любому из пп.1-4, где возрастные и/или дегенеративные заболевания нервно-скелетно-мышечной системы представляют собой ассоциированные с митохондриями нервно-скелетно-мышечные заболевания, в частности ассоциированные с митохондриями нервно-скелетно-мышечные заболевания, выбранные из заболеваний центрального стержня и заболеваний, ассоциированных с атрофией зрительного нерва 1 типа (ОРА1).

7. Применение фармацевтической комбинации для предупреждения, стабилизации и/или уменьшения количества жалоб, связанных с возрастными заболеваниями, и/или жалоб, связанных с дегенеративными заболеваниями, при этом указанная фармацевтическая комбинация содержит метформин и галантамин, где жалобы, связанные с возрастными заболеваниями, и/или жалобы, связанные с дегенеративными заболеваниями, выбраны из группы, включающей мышечную слабость, сниженную мышечную силу, нервно-мышечную дегенерацию, сниженную подвижность, нарушенный иммунный ответ, нарушение метаболизма, общую слабость.

8. Применение фармацевтической комбинации для улучшения показателя продолжительности жизни и/или продолжительности жизни с сохранением здоровья, при этом указанная фармацевтическая комбинация содержит метформин и галантамин, где улучшенный показатель продолжительности жизни и/или продолжительности жизни с сохранением здоровья выбраны из группы, включающей ослабление или стабилизацию жалоб, связанных с возрастными заболеваниями, ослабление или стабилизацию дегенеративной дисфункции и жалоб, связанных с дегенеративными заболеваниями, относительно состояния субъекта до введения фармацевтической комбинации или относительно контрольной популяции, при этом жалобы, связанные с возрастными заболеваниями, и/или жалобы, связанные с дегенеративными заболеваниями, выбраны из группы, включающей мышечную слабость, сниженную мышечную силу, нервно-мышечную дегенерацию, сниженную подвижность, нарушенный иммунный ответ, нарушение метаболизма, общую слабость.

9. Применение фармацевтической комбинации по п.7 или 8, где жалобы, связанные с возрастными заболеваниями, и/или жалобы, связанные с дегенеративными заболеваниями, выбраны из группы, включающей мышечную слабость, сниженную мышечную силу, нервно-мышечную дегенерацию и сниженную подвижность.

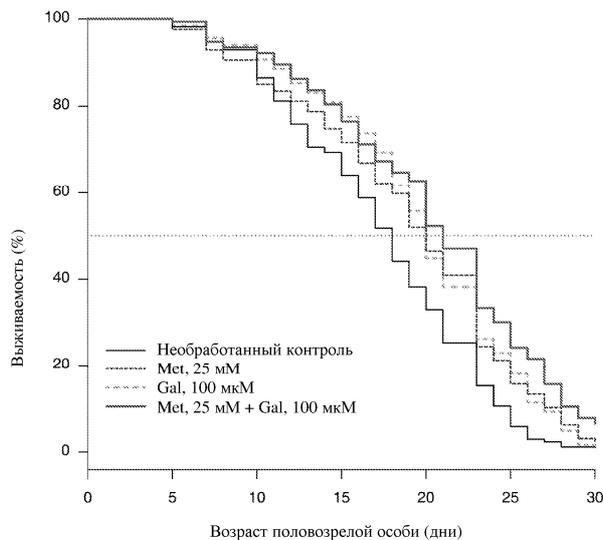
10. Применение фармацевтической комбинации по п.7 или 8, где жалоба, связанная с возрастными заболеваниями, и/или жалоба, связанная с дегенеративными заболеваниями, представляет собой общую слабость.

11. Применение по любому из пп.1-6, где метформин и галантамин вводятся субъекту в субтерапевтической дозе.

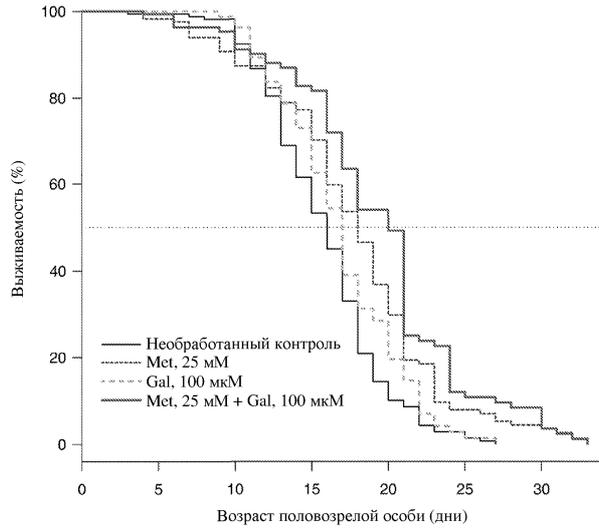
12. Применение фармацевтической комбинации по любому из пп.7-10, где метформин и галантамин вводятся субъекту в субтерапевтической дозе.

13. Применение по любому из пп.1-6, где субъект представляет собой субъекта-человека.

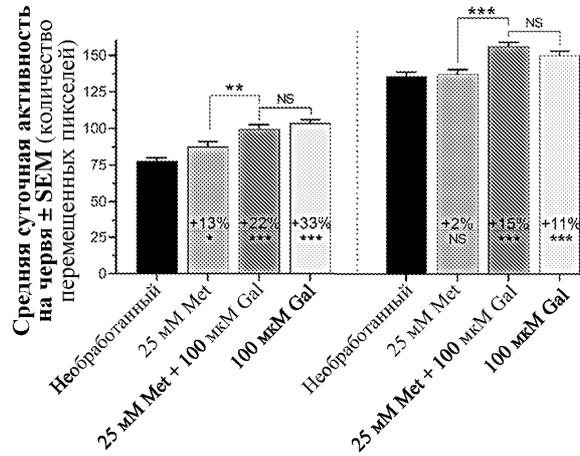
14. Применение фармацевтической комбинации по любому из пп.7-10, где субъект представляет собой субъекта-человека.



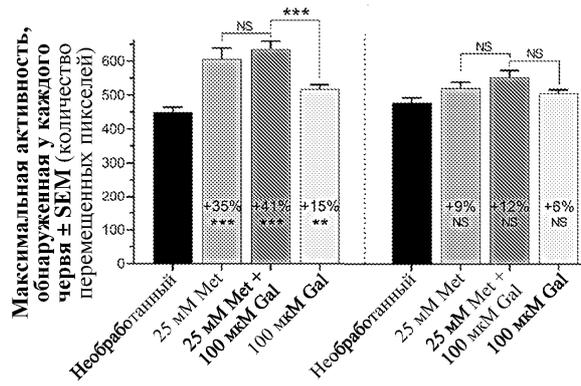
Фиг. 1



Фиг. 2

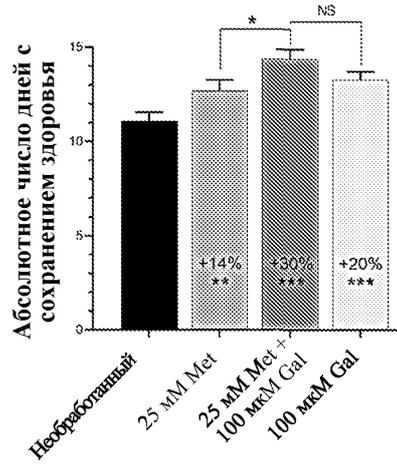


Фиг. 3А

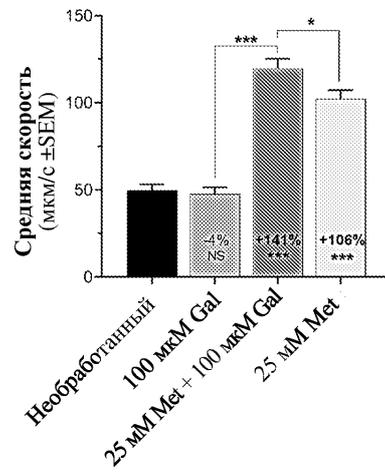


Фиг. 3В

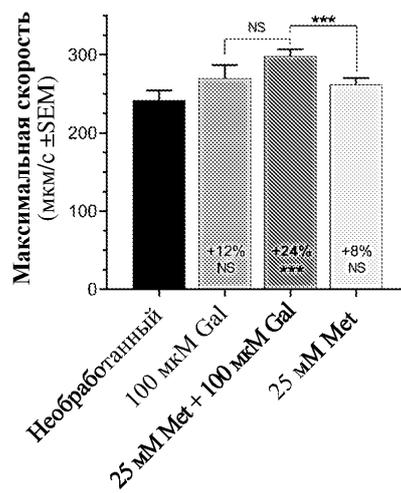
044059



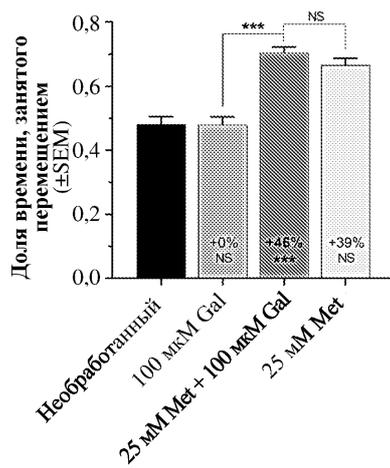
Фиг. 3С



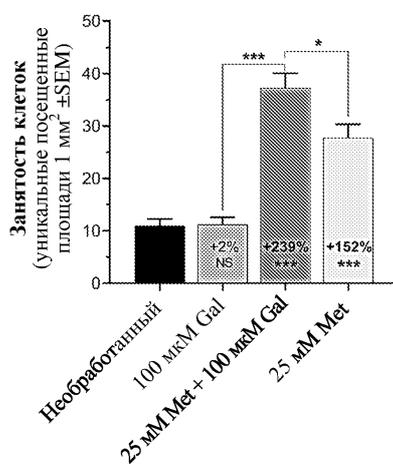
Фиг. 4А



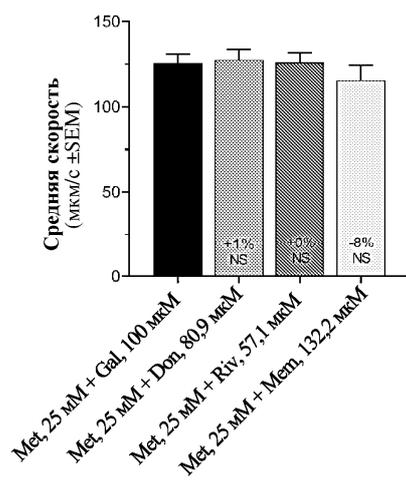
Фиг. 4В



Фиг. 4С

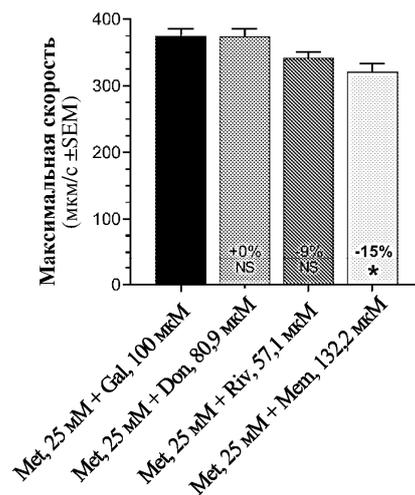


Фиг. 4D

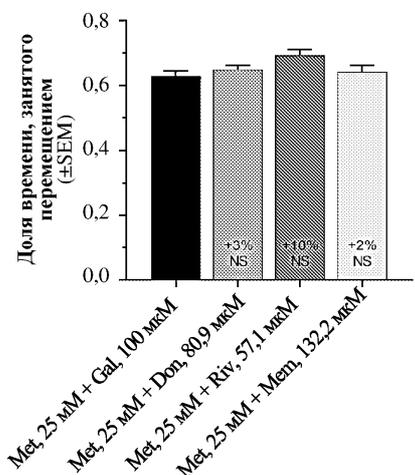


Фиг. 5А

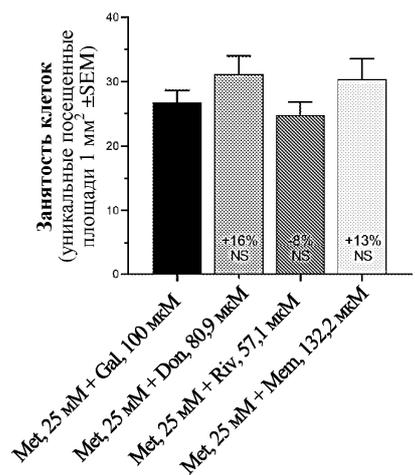
044059



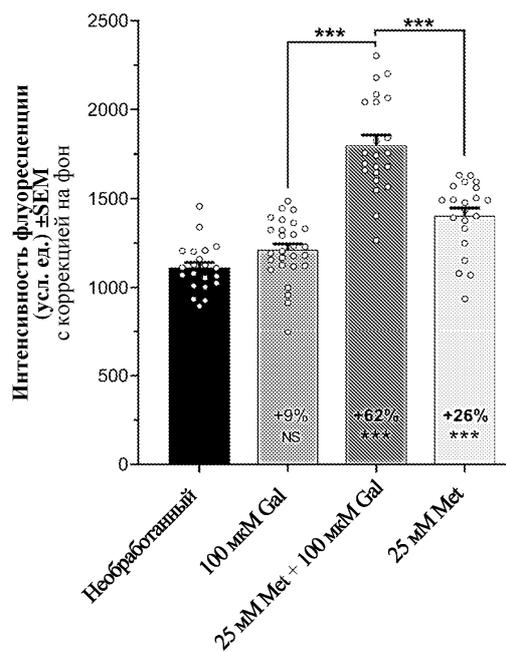
Фиг. 5B



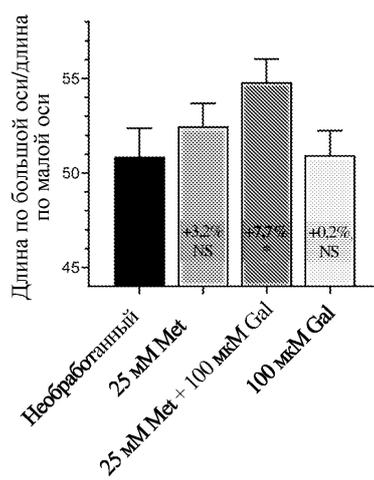
Фиг. 5C



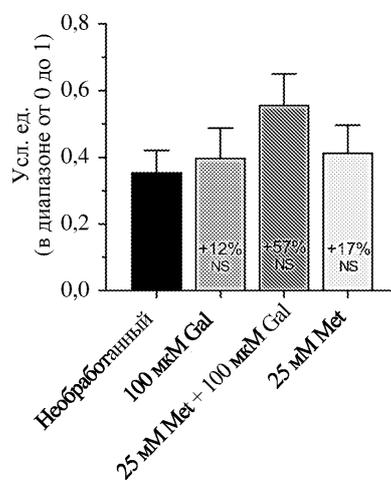
Фиг. 5D



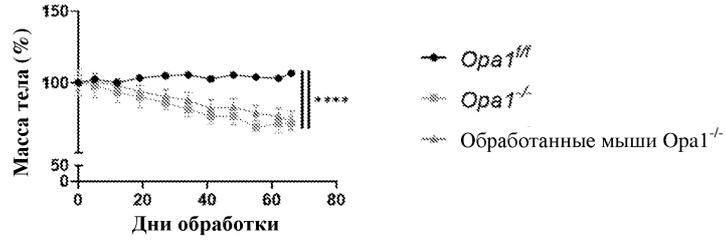
Фиг. 6



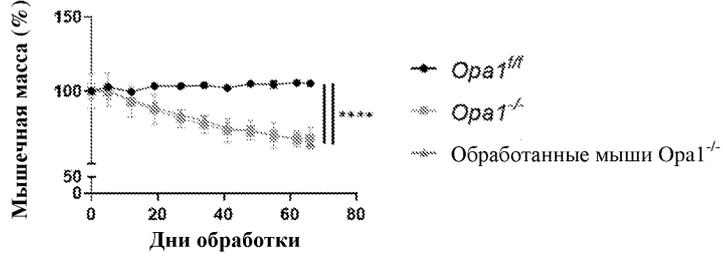
Фиг. 7А



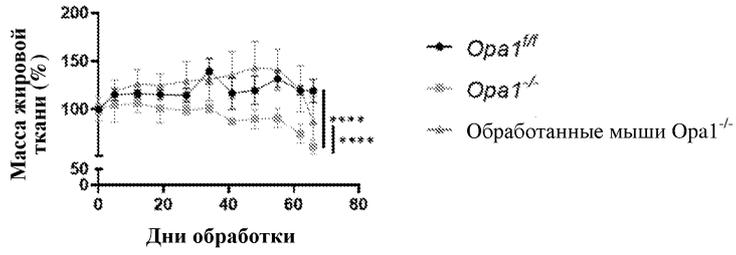
Фиг. 7В



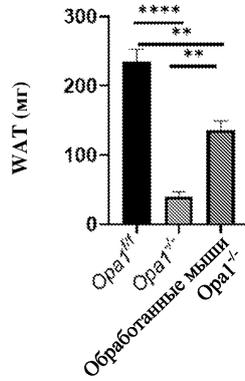
Фиг. 8А



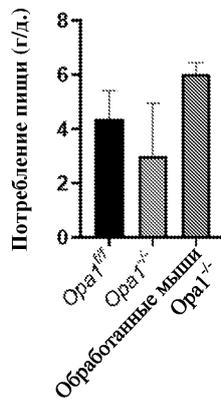
Фиг. 8В



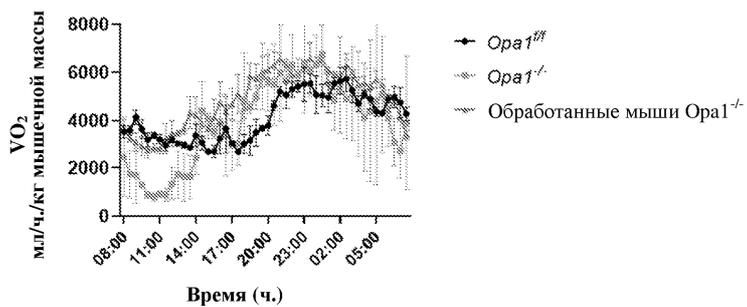
Фиг. 8С



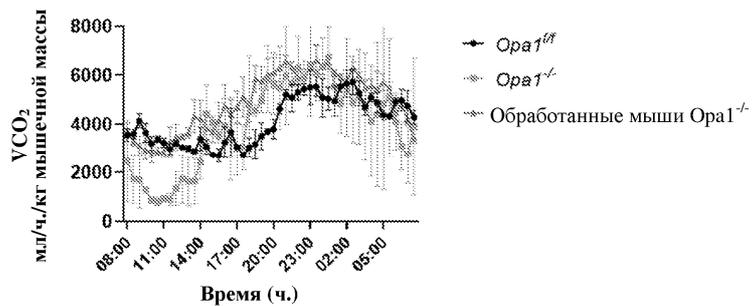
Фиг. 8D



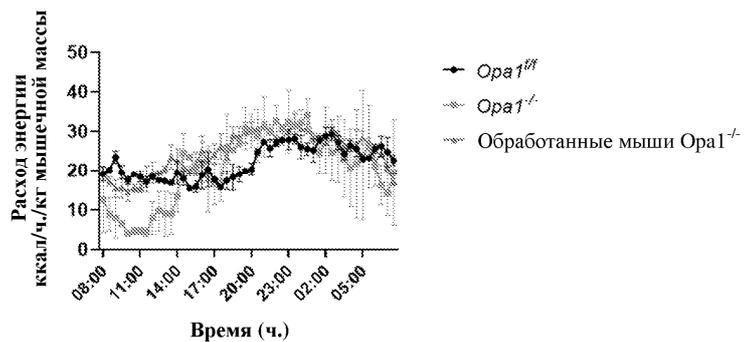
Фиг. 8Е



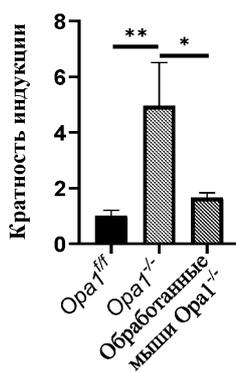
Фиг. 8F



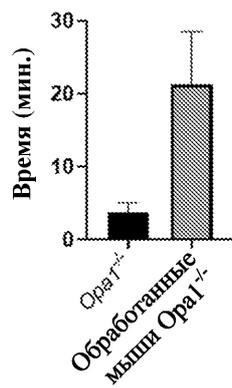
Фиг. 8G



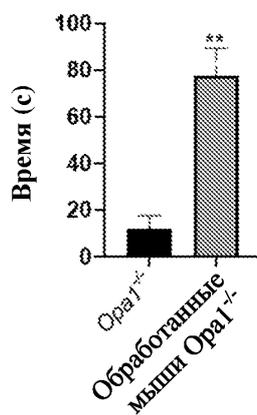
Фиг. 8H



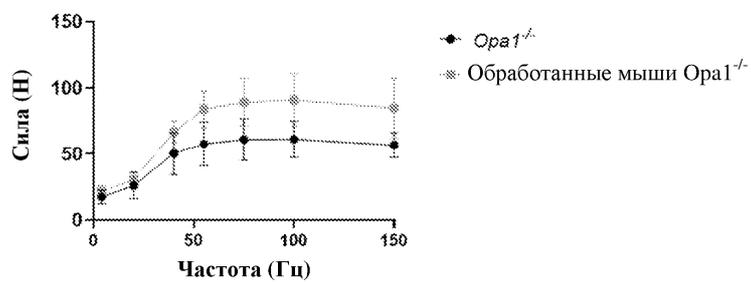
Фиг. 8I



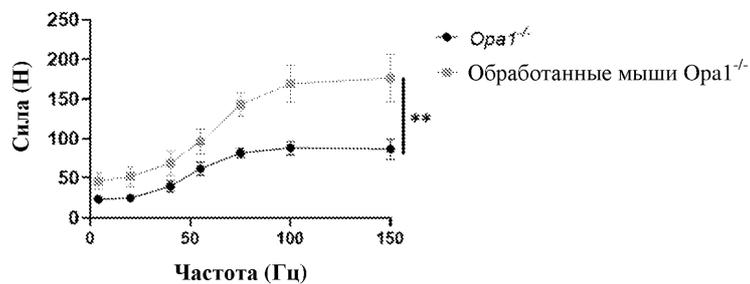
Фиг. 9А



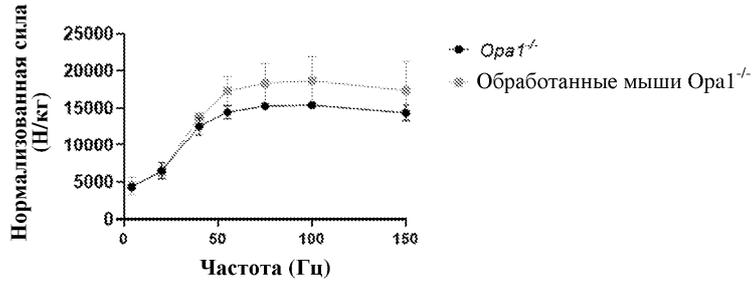
Фиг. 9В



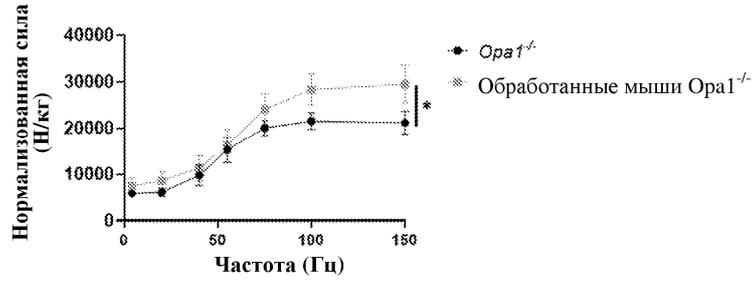
Фиг. 9С



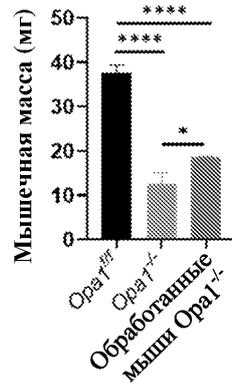
Фиг. 9D



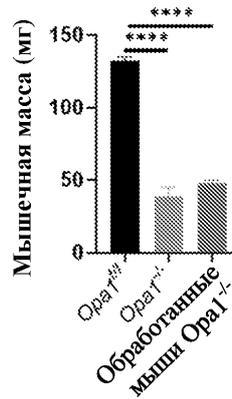
Фиг. 9Е



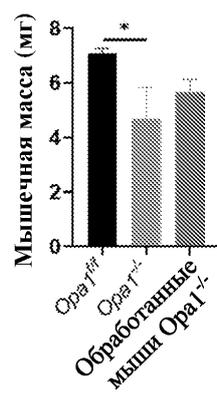
Фиг. 9F



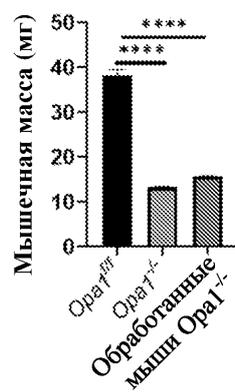
Фиг. 10А



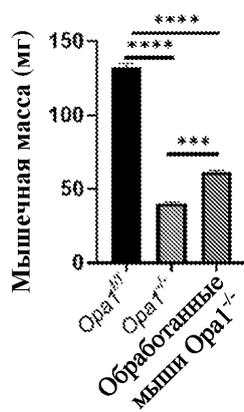
Фиг. 10В



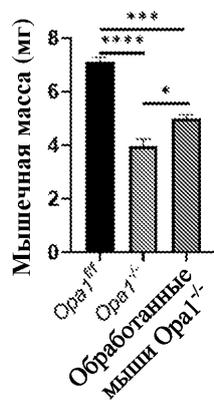
Фиг. 10С



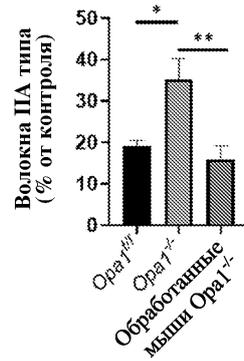
Фиг. 10D



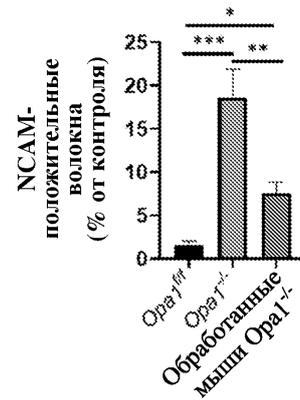
Фиг. 10Е



Фиг. 10F



Фиг. 10G



Фиг. 10H

